

Untersuchungen zur Herstellung,
Charakterisierung und Stabilisierung
von Liposomendispersionen
zur parenteralen Anwendung
von Coenzym Q10

Angelika Schmid

Disbui. München

1988

Untersuchungen zur Herstellung, Charakterisierung
und Stabilisierung von Liposomendispersionen
zur parenteralen Anwendung von Coenzym Q10

D I S S E R T A T I O N

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

ANGELIKA SCHMID
aus Illertissen

München 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Thoma
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reimann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.1988

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Thoma am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater,

Herrn Prof. Dr. K. Thoma,

danke ich für die Auswahl des Themas, die wissenschaftliche Anleitung sowie die wertvolle Förderung und Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen.

Herrn Dr. W. Schartau, Zoologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Durchführung von Messungen mittels Analytischer Ultrazentrifugation und die Einführung in die Auswertungsmethodik.

Herrn Dr. G. Wanner, Botanisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Aufnahme von elektronenmikroskopischen Abbildungen.

Herrn Dr. G. Ziegler, Fraunhofer-Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung in München danke ich für die Durchführung von Messungen mittels Registrierender Differential-Kalorimetrie.

Allen, die durch Rat, Tat und
Motivierung zum Gelingen dieser
Arbeit beigetragen haben

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einführung</u>	13
B. <u>Ergebnisse der Untersuchungen</u>	19
I. Untersuchungen zum Einfluß der Zusammensetzung und der Herstellungsmethode auf Durchmesser und Homogenität kleiner unilamellarer Vesikel	19
1. Detergentsdialyse-Liposomen	19
1.1 Einfluß von Lipidart und isotonisierendem Zusatz	20
1.2 Einfluß von inkorporiertem Ladungsträger	23
1.3 Einfluß von inkorporiertem Cholesterol	25
1.4 Einfluß der Coenzym Q10-Konzentration	26
1.5 Einfluß der Lipidkonzentration	28
1.6 Einfluß der Mischmizellgröße auf die bei der Detergentsdialyse entstehende Vesikelgröße	30
1.7 Diskussion	32
2. Einfluß der Herstellungsmethode auf den mittleren Durchmesser und die Homogenität von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV)	37
2.1 Cholesterolfreie Vesikel	39
2.2 Cholesterolhaltige Vesikel	39
2.3 Diskussion	40

II. Vergleichende Untersuchungen zur Charakterisierung der Vesikelpräparate	42
1. Gelpermeationschromatographie und Elektronenmikroskopie	42
1.1 Gelpermeationschromatographie	42
1.2 Elektronenmikroskopie	47
1.3 Vergleich der Ergebnisse der Bestimmung des mittleren Vesikeldurchmessers über Gelchromatographie, Elektronenmikroskopie und Dynamisches Laser-Light-Scattering	51
1.4 Diskussion	53
2. Analytische Ultrazentrifugation	56
3. Bestimmung des Lipid- und Arzneistoffgehaltes der Vesikelpräparationen	61
3.1 Detergentsdialyse-Vesikel	62
3.2 Beschallte Vesikel nach der Aufarbeitung	64
3.3 Chemische Stabilität und Adsorptionsverhalten von Coenzym Q10	65
3.4 Diskussion	66
4. Prüfung von Vesikeldispersionen auf nicht inkorporiertes Coenzym Q10	68
5. Untersuchung mit Registrierender Differential-Kalorimetrie (DSC)	71

III. Untersuchungen zur Lagerstabilität der Vesikel- präparationen	75
1. Lagerstabilität der Vesikel im Hinblick auf die oxidative Veränderung ungesättigter Lipide	75
2. Lagerstabilität der Dispersionen im Hinblick auf Sedimentation	81
2.1 Visuelle Beurteilung der Vesikeldispersionen . .	81
2.2 Bestimmung des Zetapotentials	86
2.3 Diskussion	88
3. Lagerstabilität der Dispersionen im Hinblick auf Vesikeldurchmesser und Homogenität	90
3.1 Detergendsialyse-Vesikel aus hydriertem Sojalecithin	90
3.2 Detergendsialyse-Vesikel aus ungesättigten Lipiden	97
3.3 Einfluß des Herstellungsverfahrens der Vesikel .	102
3.4 Zusammenfassende Diskussion	107
IV. Beurteilung der Möglichkeiten und Grenzen eines Coenzym Q10-haltigen Liposomenpräparates zur An- wendung als Arzneimittel auf Grund der durchge- führten Untersuchungen	109
1. Überlegungen an Hand der Literatur zur Bio- verfügbarkeit des liposomalen Coenzym Q10 am Zielorgan in Abhängigkeit von der Rezeptur . . .	109



2.	Realisierbarkeit der Produktion und der Qualitätssicherung eines Coenzym Q10- haltigen Injektionspräparates	111
C.	<u>Experimenteller Teil</u>	115
I.	Herstellung der Liposomen	115
1.	Geräte	115
2.	Materialien	115
3.	Durchführung	117
3.1	Detergentsdialyse-Verfahren	117
3.2	Beschallungsverfahren und Hochdruckdüsen- homogenisierung	121
II.	Methoden zur Charakterisierung der Liposomen	122
1.	Dynamisches Laser-Light-Scattering	122
2.	Gelchromatographie	123
3.	Elektronenmikroskopie	126
4.	Analytische Ultrazentrifugation	126
5.	Bestimmung des Lipidgehaltes	128
6.	Bestimmung des Coenzym Q10-Gehaltes	129
7.	Prüfung auf reduziertes Coenzym Q10	130
8.	Prüfung auf nicht inkorporiertes Coenzym Q10	131
9.	DSC-Untersuchungen	132

III. Methoden zur Überprüfung der Lagerstabilität der Vesikeldispersionen	133
1. Untersuchung der Lipidoxidation	133
2. Visuelle Prüfung auf Sedimentation	133
3. Bestimmung des Zetapotentials	134
D. <u>Z u s a m m e n f a s s u n g</u>	136
E. <u>L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s</u>	141

Erklärung häufig verwendeter Abkürzungen

Chol:	Cholesterol
DCP :	Dicetylphosphat
DLLS:	Dynamisches Laser-Light-Scattering
DMPA:	Dimyristoylphosphatidsäure
DPPC:	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DSPC:	Distearoylphosphatidylcholin
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EL :	Eilecithin
LK :	Lecithinkonzentration
MLV :	Multilamellare Vesikel
PS :	Phosphatidylserin
Q10 :	Coenzym Q10
SL :	Sojalecithin
SLH :	hydriertes Sojalecithin
SUV :	kleine unilamellare Vesikel
UPM :	Umdrehungen pro Minute

In die Angaben zur Zusammensetzung der Vesikelrezepturen sind jeweils die molaren Anteile der Komponenten einbezogen.

Die Bezeichnung "Mol%" bezieht sich immer auf die molare Phosphatidylcholinkonzentration.

A. E i n f ü h r u n g

In den letzten Jahren ist ein ständig wachsendes Interesse an Arzneiformen zu verzeichnen, die neue Wege des gezielten Arzneistofftransportes zum Wirkort und der kontrollierten Wirkstoffabgabe am Zielorgan eröffnen. Die Forschung konzentriert sich dabei unter anderem auf kolloidale Arzneistoffträger, unter denen die Arzneiform der Liposomen einen immer breiteren Raum einnimmt, was sich in einer Flut von Veröffentlichungen, Übersichtsartikeln und Monographien niederschlägt.

Liposomen wurden in den 60er Jahren entdeckt auf der Suche nach künstlichen Membransystemen, die der biologischen Membran möglichst entsprechen sollten (1):

Phospholipide und ähnlich aufgebaute amphiphile Moleküle lagern sich in wäßrigen Medien unter bestimmten Bedingungen zu sogenannten Lipidbilayern zusammen - größeren Molekülverbänden aus zwei monomolekularen Schichten, bei denen die hydrophilen Molekülteile dem Wasser zugewandt sind und die lipophilen Ketten sich ins Innere der Doppelschicht orientieren (2). Zur Minimierung der Oberfläche bilden diese Bilayerstrukturen geschlossene Hohlkugeln aus, deren Innenraum mit wäßrigem Medium gefüllt ist. Spontan entstehen bei der Quellung von Phospholipiden in einem Überschuß an wäßrigem Medium sogenannte multilamellare Vesikel (MLV) aus mehreren konzentrisch angeordneten Hohlkugeln (1). Durch besondere Präparationsverfahren oder durch Energieeinwirkung auf MLV kann man unilamellare Vesikel erzeugen, deren wäßriger Innenraum nur von einer Bilayerschicht umschlossen wird (Übersicht in (3)). Abb. 1 zeigt schematisch den Aufbau eines unilamellaren Liposoms.

1970 wurde damit begonnen, die Vesikel nicht nur als Modellmembran einzusetzen, sondern auch einen möglichen Einsatz als Arzneistoffträger in Betracht zu ziehen (4). Wasserlösliche Wirkstoffe können dazu ins wäßrige Innenvolumen der Vesikel eingeschlossen werden, während bei lipophilen Arzneistoffen eine Einlagerung in die Vesikelmembran erfolgt.

Durch die Applikation des liposomal verarbeiteten Arzneistoffs erhofft man sich in den meisten Fällen eine Veränderung der

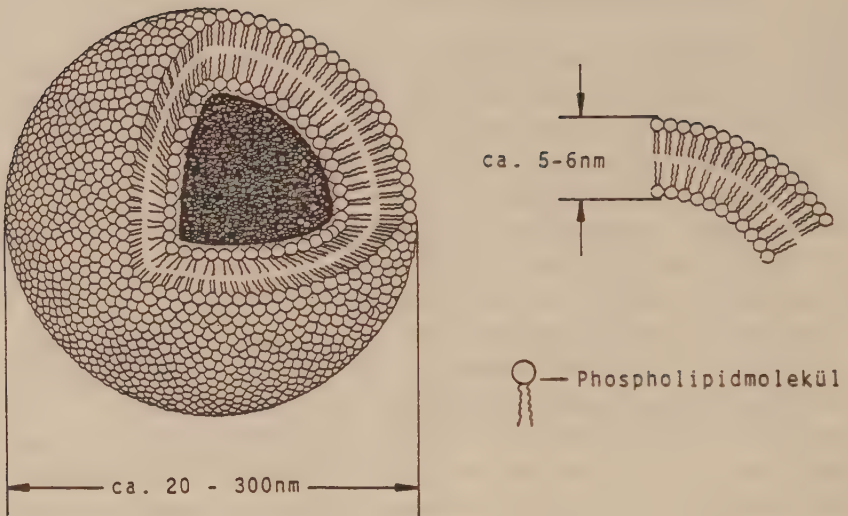


Abb. 1 Schematische Darstellung des Aufbaus und der Größen-
dimensionen eines unilamellaren Liposoms im Anschnitt

Pharmakokinetik im Vergleich zur Applikation als Lösung oder Suspension.

Nach einer Anlaufzeit von fast 20 Jahren befinden sich jetzt einige erfolgversprechende liposomale Präparate in der klinischen Prüfung (5,6,7). Die Applikation erfolgt in der Regel parenteral oder topisch.

Die Vorteile der Liposomen liegen häufig in einer geringeren Toxizität der Präparate im Vergleich zur nicht verkapselten Zubereitung bei gleichbleibender oder verbesserter Wirkung. Dies trifft beispielsweise für die Wirkstoffe Doxorubicin und Amphotericin B zu.

Daneben ist in bestimmten Fällen eine gezielte Anreicherung des Arzneistoffs am Wirkort durch die Eigenschaften der Vesikelstruktur selbst oder durch Steuerung über Antikörper möglich. Durch die natürliche Anreicherung von Liposomen im reticuloendothelialen System kann beispielsweise immunstimulierendes Muramyltripeptid gezielt in Macrophagen gelangen.

Solche Anreicherungseffekte können auch zu diagnostischen Zwecken ausgenutzt werden wie beispielsweise bei der Tumordarstellung mit liposomal verkapseltem, markiertem Indium. Ein weiteres Ziel beim Einsatz liposomaler Arzneiformen in klinischen Studien ist die Formulierung von gut verträglichen Retardarzneiformen wie beispielsweise für Pilocarpin am Auge.

Neben diesen kurz skizzierten Forschungsprojekten im fortgeschrittenen Stadium finden sich in der Literatur für eine kaum überschaubare Anzahl an Arzneistoffen pharmakologische Studien am Tier in liposomal verkapselter Form.

Unter den Stoffen, bei denen das Ergebnis weniger Tierstudien die Applikation in liposomaler Form hoffnungsvoll erscheinen läßt, findet sich der Wirkstoff Coenzym Q10:

Coenzym Q10 (Abb. 2), ein Coenzym der mitochondrialen Atmungskette, wird seit 1975 zur Behandlung verschiedener kardialer Erkrankungen, wie beispielsweise Herzinsuffizienz, in Japan eingesetzt. Dort befindet es sich in Form einer großen Zahl an Weichgelatine-, Granulat- und Tablettenpräparaten auf dem Markt. Bedingt durch die extreme Lipophilie des Moleküls (Wasserlöslichkeit $< 4 \text{ ng/ml}$) (8), welche auf die isoprenoide Seitenkette zurückgeht, wird Coenzym Q10 zu einem pharmazeutischen Problemарzneistoff, für den in Abhängigkeit von der Zubereitung große Unterschiede in der Bioverfügbarkeit bekannt geworden sind (9).

Untersuchungen zur intravenösen Applikation von Coenzym Q10 wurden in erster Linie in tensidsolubilisierter Form und in Form von Emulsionen durchgeführt (10,11,12). In einer Arbeitsgruppe fanden auch liposomal verkapselte Formen Anwendung (13,14).

Diese rein pharmakologisch orientierten Studien am Tier kommen zu dem Schluß, daß die Coenzym Q10-Konzentration im Herz nach Verabreichung als konventionelles Solubilisat mit dem Polyoxyethylenaddukt des hydrierten Rizinusöls HCO-60 niedriger ist, als nach Applikation emulsoider oder liposomaler Präparate (12,14). Werden Emulsionen appliziert, so erhöht

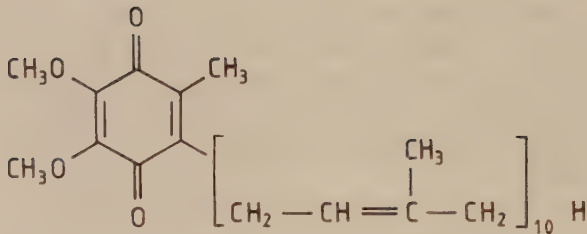


Abb. 2 Strukturformel von Coenzym Q10 (= Ubidecarenon;
2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl-benzochinon)

die Verwendung von Phospholipid als Emulgator den Arzneistoffspiegel im Herz (10). Zudem wird bei phospholipidhaltigen Emulsionen im Vergleich zum Tensidsolubilisat ein höherer Anteil an der enzymatisch reduzierten Hydrochinonform im Herz gefunden, die eine antioxidativ wirksame Form des Arzneistoffs darstellt (12).

Eine Studie, die markiertes Coenzym Q10 parenteral appliziert, um den Herzmuskel diagnostisch darzustellen, verwendet ebenfalls liposomal verarbeitetes Coenzym Q10 im Vergleich zum Tensidsolubilisat (HCO-60). Während in bezug auf den jeweils erreichten Blutspiegel die liposomale Präparation im Herzmuskel 10-fach angereichert wird, sind beim Tensidsolubilisat im Herz nur 10% der im Blut gefundenen Konzentration zu finden (15).

Neben einem günstigeren pharmakokinetischen Verhalten im Vergleich zum Tensidsolubilisat ist von einem phospholipidhaltigen Präparat vor allem auch eine geringere Toxizität und ein geringeres Sensibilisierungsrisiko zu erwarten. Hohe Dosen an Phosphatidylcholin werden intravenös toleriert (16). Die parenterale Anwendung von Tensiden als Lösungsvermittler oder Emulgator ist hingegen mit Nebenwirkungen verbunden: Eingehend untersucht worden sind die parenteralen Nebenwirkungen von Poly(oxyethylen)-40-Rizinusöl (Cremophor EL) (17,18), das dem für die Coenzym Q10-Solubilisierung geeigneten Tensid HCO-60 vom Aufbau her sehr ähnlich ist.

Zielsetzung der Arbeit

Trotz aller bisher beschriebenen Fortschritte in der pharmazeutisch orientierten Liposomenforschung zeichnen sich auch immer stärker die Probleme ab, die sich aus dem komplexen Zusammenspiel zwischen Liposom und Arzneistoff einerseits und Liposom und Organismus andererseits ergeben (19).

Einer Fülle an pharmakologisch orientierten Studien steht dabei eine weitaus geringere Anzahl an Arbeiten gegenüber, die sich gezielt mit pharmazeutisch-technologischen Aspekten beschäftigt.

Dem Einfluß von Rezeptur und Herstellungsmethode auf die Ausgangseigenschaften und vor allem auf die Lagerstabilität der resultierenden Vesikel sind hauptsächlich Arbeiten gewidmet, die sich mit dem Einschluß wasserlöslicher Arzneistoffe beschäftigen. Dabei stellt die Dichtigkeit der Liposomenmembran das wesentliche Stabilitätskriterium dar (20).

Die systematische Erforschung des Einbaus lipophiler Arzneistoffe in die Liposomenmembran, wofür sich abweichende Stabilitätskriterien ergeben, wurde bisher eher vernachlässigt und beschränkt sich im wesentlichen auf den Einbau von Corticoiden (21,22) und wenigen Cytostatika (23,24).

Häufig wird bei Stabilitätsuntersuchungen mit Materialien und Methoden gearbeitet, die die Umsetzung in eine Arzneimittelherstellung wegen des hohen Kostenaufwands der Lipide und der mangelnden Übertragbarkeit des Herstellungsverfahrens auf den Produktionsmaßstab undenkbar erscheinen lassen.

Hinzu kommt, daß die Lagerstudien meist mit Lipidkonzentrationen durchgeführt werden, die insbesondere bei membraninkorporierten Wirkstoffen kaum therapeutische Wirkstoffkonzentrationen im Präparat ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es deshalb, an Hand des extrem lipophilen Arzneistoffs Coenzym Q10 in systematischer Form neue pharmazeutisch-technologische Erkenntnisse über die Inkorporierbarkeit lipophiler Arzneistoffe in die Liposomenwand zu gewinnen.

Der Einbau des Coenzym Q10-Moleküls sollte jedoch nicht nur Modellcharakter besitzen. Die oben beschriebenen pharmakologischen Studien weisen darauf hin, daß von einem Coenzym Q10-haltigen liposomalen Präparat zur i.v.-Injektion Vorteile gegenüber einem parenteral zu applizierenden Tensidsolubilisat erwartet werden können. Deshalb wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen zum Einschluß des Coenzym Q10 in Liposomen auf Zubereitungen gelegt, die sich für eine spätere Anwendung als intravenös injizierbares Arzneimittel eignen sollten.

Im Gegensatz zu den früheren Studien mit Coenzym Q10-haltigen Vesikeln (13,14) galt es hierbei, unter Verwendung von Lipidmaterial und Herstellungsmethoden, die ein zukünftiges "Scaling Up", das heißt eine Übertragung in den Produktionsmaßstab, ermöglichen, hochkonzentrierte, lagerstabile Vesikeldispersionen zur i.v.-Injektion zu entwickeln.

Da in Abhängigkeit von Vesikelgröße und Lipidzusammensetzung bedeutende Unterschiede in der Pharmakokinetik der Vesikel zu erwarten sind, sollte ein möglichst breites Spektrum unterschiedlicher arzneistofffreier und Coenzym Q10-haltiger Präparationen in die Untersuchung einbezogen werden.

Die Präparationen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung aus unterschiedlichen Herstellungsverfahren sollten jeweils beurteilt werden hinsichtlich Vesikeldurchmesser und -homogenität, Lagerstabilität und inkorporierbarer Coenzym Q10-Konzentration.

Da die Größe von Liposomen, abgesehen von MLV, in einem Bereich von ca. 20 nm bis 300 nm unterhalb der Erfassungsgrenze des Lichtmikroskops liegt, wurde die Anwendung einer Vielzahl spezifischer Analysenmethoden zur Sicherstellung der Qualität der Vesikelpräparationen notwendig.

Aus dem Einfluß der liposomalen Zusammensetzung und des Herstellungsverfahrens auf die Ausgangseigenschaften und die Lagerstabilität der Coenzym Q10-haltigen Vesikel sind Rückschlüsse auf die Inkorporierbarkeit anderer schwerlöslicher Pharmaka zu erwarten.

B. Ergebnisse der Untersuchungen

I. Untersuchungen zum Einfluß der Zusammensetzung und der Herstellungsmethode auf Durchmesser und Homogenität kleiner unilamellarer Vesikel

Für die Pharmakokinetik intravenös zu applizierender Liposomen spielt der mittlere Vesikeldurchmesser eine entscheidende Rolle. Große unilamellare Vesikel (über 100 nm) und multilamellare Vesikel (bis zu einigen μm) wandern proportional zu ihrer Größe in kürzester Zeit nahezu quantitativ in Leber, Milz und Knochenmark ab, da diese Organe die größte Phagozytoseaktivität besitzen. Kleine unilamellare Vesikel (SUV) mit einem Durchmesser von 20 bis 100 nm hingegen werden von phagozytierenden Systemen weniger rasch beseitigt und weisen Plasmahalbwertszeiten von bis zu 23 h auf (19).

Soll der liposomal applizierte Wirkstoff - wie im Falle von Coenzym Q10 - auch zu anderen Zielorganen als Leber, Milz und Knochenmark gelangen, so sind folglich SUV mit möglichst geringem Anteil an größeren Vesikeln zu bevorzugen.

Unter Verwendung geeigneter Herstellungsmethoden sollte in den folgenden Untersuchungen überprüft werden, welche Rezepturen zur Herstellung von homogenen Coenzym Q10-haltigen Liposomen im Bereich von 20 bis 100 nm geeignet sind.

1. Detergensdialyse-Liposomen

Mit der Detergensdialyse-Methode lassen sich homogene Vesikelpopulationen sowohl im Labormaßstab als auch in größeren Ansätzen auf lipid- und arzneistoffschonende Weise herstellen (25,26). Der weitaus größte Teil der Präparationen der Untersuchung wurde mit dieser Methode hergestellt. Das Prinzip soll hier kurz erläutert werden:

Die Methode geht aus von einer mischmizellaren Lösung aus Lipid und lipophilem Arzneistoff solubilisiert mit einem Detergens. Für die Herstellung von SUV dient in der Regel Natriumchololat als Detergens. Wird den Mischmizellen durch Dialyse das

Detergens mit konstanter Geschwindigkeit entzogen, so bilden sich bei geeigneter Rezeptur Vesikel einheitlicher Größe.

Im folgenden wurde untersucht, welchen Einfluß verschiedene Rezepturvariationen auf den mittleren Durchmesser und die Homogenität der entstehenden Vesikel haben.

1.1 Einfluß von Lipidart und isotonisierendem Zusatz

Bei der Herstellung von Liposomen hat die Wahl des Lipides entscheidende Auswirkungen. Unter anderem werden die chemische und physikalische Lagerstabilität (3), die Pharmakokinetik der Vesikel (19) und nicht zuletzt der finanzielle Aufwand durch die Art des Lipides bestimmt.

Deshalb sollte zunächst abgeklärt werden, mit welchem Lipidmaterial es gelingt, geeignete Coenzym Q10-haltige Vesikel herzustellen.

Am häufigsten finden in der Literatur natürliches ungesättigtes Soja- und Eilecithin sowie synthetische gesättigte Phosphatidylcholine Anwendung.

Da Sojalipide bis zu 1000mal preiswerter als andere Lipide erhältlich sind, wurde in die Untersuchung neben Ei- und Sojalecithin (EL und SL) das bisher weniger gebräuchliche hydrierte Sojalecithin (SLH) einbezogen anstatt eines gesättigten synthetischen Lipids.

Für die i.v.-Applikation von Liposomen ist ein isotonisierender Zusatz zum Dispersionsmedium erforderlich. In der Literatur sind Einflüsse der Ionenstärke des Dispersionsmediums auf die Lagerstabilität von Vesikeln beschrieben (27). Zudem ist ein Einfluß der Ionenstärke auf die Bildung der mischmizellaren Liposomenvorstufe zu erwarten (25). Deshalb sollte neben der Lipidart auch die Ionenstärke des isotonisierenden Zusatzes durch den Austausch von Kochsalz gegen Sorbit variiert werden.

Die Größenbestimmung der verschiedenen Vesikelpräparationen erfolgte über die Methode des Dynamischen Laser-Light-Scat-

terings (DLS). Die Methode beruht auf der unterschiedlichen Brownschen Molekularbewegung verschieden großer Teilchen, die zu unterschiedlicher zeitlicher Fluktuation der Streulichtintensität bei einem durch die Probe geleiteten Laserstrahl führt (28). Die hohe Reproduzierbarkeit der Methode zeigte sich bei unseren Messungen in einer relativen Standardabweichung von 0,4% ($n = 10$).

In Kombination mit der sehr guten Reproduzierbarkeit der Teilchengröße beim Detergentsdialyse-Verfahren (relative Standardabweichung bei 8 Herstellungschargen 1,1%) konnten auch geringe Teilchengrößenunterschiede erfaßt werden, die auf Rezeptureinflüsse zurückzuführen sind.

Neben der Bestimmung des mittleren Teilchendurchmessers erlaubt die DLS-Methode eine Abschätzung der Breite der Größenverteilung über den Polydispersitätsindex. Mit steigender Heterogenität der Größenverteilung kann dieser Index Werte von 0 bis 1 annehmen. Statt des theoretischen 0-Wertes erhält man in der Praxis bei monodispersen Eichlatizes einen Wert von $\text{ca. } 0,03 \pm 0,01$. Bis zu einem Wert von 0,1 wird die Verteilung noch als schmal betrachtet (28), während Werte zwischen 0,3 und 0,4 bereits auf polymodale Größenverteilungen hinweisen können.

In den folgenden Abbildungen dieses Kapitels ist der Polydispersitätsindex als Liniendiagramm in das Säulendiagramm der Teilchengrößen eingelagert.

Beide Diagramme zeigen jeweils die Mittelwerte aus zwei produzierten Chargen.

Wie in Abb. 3 dargestellt ist, gelang es bei allen drei Lipidarten, sowohl arzneistofffreie als auch Coenzym Q10-haltige Vesikel im geforderten Teilchengrößenbereich von 20 bis 100 nm Durchmesser herzustellen. Während der Austausch von Sojalecithin gegen das Eilecithin praktisch keinen Unterschied im Durchmesser zur Folge hat, beeinflusst sowohl der Isotonisierungszusatz als auch der Übergang von den ungesättigten zum gesättigten Lipid (SLH) den mittleren Durchmesser.

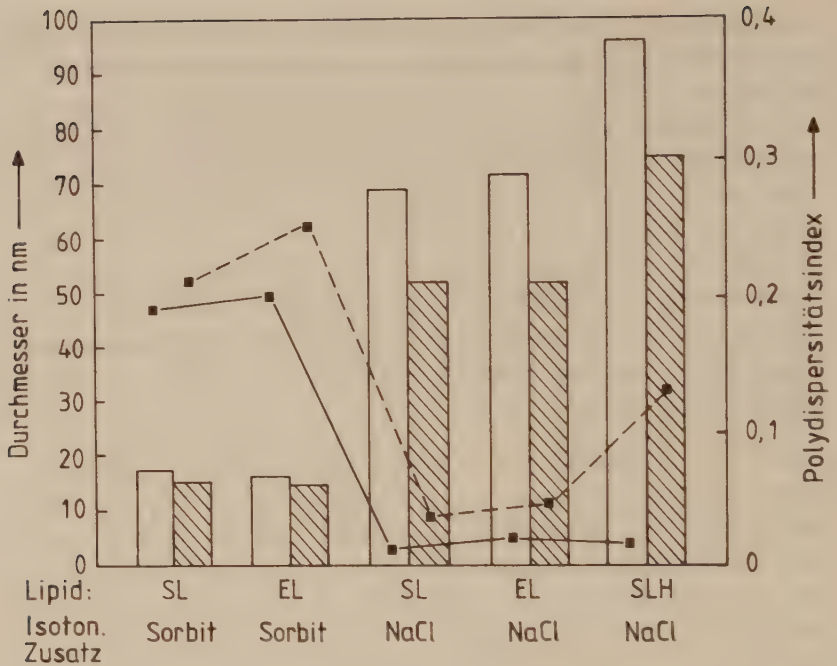


Abb. 3 Einfluß von Lipidart und Isotonisierungszusatz auf den mittleren Durchmesser und die Polydispersität arzneistofffreier und Coenzym Q10-haltiger Detergentsdialyse-Vesikel (LK: 30 mg/ml)

- Durchmesser arzneistofffrei
- ▨ Durchmesser 5 Mol% Q10
- Polydispersität arzneistofffrei
- - Polydispersität 5 Mol% Q10

Die kleinsten Vesikel erhält man bei der Kombination von ungesättigten Lipiden mit sorbithaltigem Dispersionsmedium, während die Vesikel aus hydriertem Lipid in NaCl-haltiger Lösung ca. den vierfachen mittleren Durchmesser besitzen. Abgesehen von den Proben mit Sorbit, sind die Coenzym Q10-haltigen Vesikel jeweils um etwa 20 bis 30 nm kleiner als die arzneistofffreien Proben, zeigen jedoch bei Änderung von Dispersionsmedium und Lipidart die gleichen Größenänderungstendenzen.

Bis auf die Vesikel aus SLH, bei denen der Arzneistoffzusatz eine deutlichere Verschlechterung der Polydispersität zur Folge hat, liegt die Polydispersität der Coenzym Q10-haltigen Vesikel nur wenig über der der arzneistofffreien Proben. Die breiteste Größenverteilung weisen offensichtlich die sorbithaltigen Proben auf.

Bei EL- und SL-Vesikeln in NaCl-haltigem Dispersionsmedium kommen die arzneistoffhaltigen Präparationen der Homogenität ideal monodisperser Systeme sehr nahe.

Nicht in die Darstellung einbezogen wurden SLH-Vesikel in sorbithaltigem Dispersionsmittel, da sich bei dieser Kombination nur extrem inhomogene große Vesikel herstellen ließen.

Die weiteren Rezepturvariationen wurden alle mit NaCl-haltigem Dispersionsmedium durchgeführt.

1.2 Einfluß von inkorporiertem Ladungsträger

Vor allem zur positiven Beeinflussung der Lagerstabilität (3), aber auch um in vivo-Wechselwirkung der Vesikel mit Zellen zu modifizieren (29), hat der Einbau geringer Mengen an negativen Ladungsträgern in die Vesikelmembran häufige Anwendung gefunden.

Neben geladenen Lipiden, deren Isolierung bzw. Synthese erheblichen Aufwand erfordert, wird zu diesem Zweck oft Dicetylphosphat (DCP) als Modellsubstanz herangezogen.

Um die Inkorporierbarkeit von Ladungsträgern in Coenzym Q10-haltige Vesikel und deren Einfluß auf Vesikeldurchmesser und Polydispersität zu überprüfen, wurden 5 bis 10 Mol% Dicetylphosphat in die Vesikel eingebaut. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Abb. 4 zeigt, daß sich Ladungsträger- und Arzneistoffzusatz jeweils in ihrem Einfluß, den Vesikeldurchmesser zu verkleinern, ergänzen.

Ein 5%iger DCP-Zusatz wirkt sich bei Coenzym Q10-haltigen Vesikeln aus SLH günstig auf die Polydispersität aus, während hier ein höherer DCP-Gehalt die Homogenität stört.

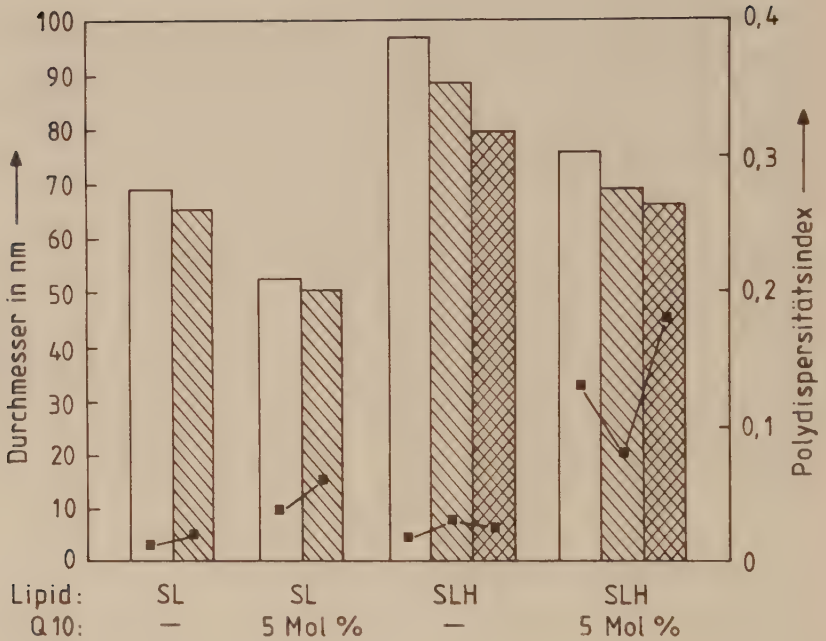


Abb. 4 Einfluß des Einbaus von Dicetylphosphat auf den mittleren Durchmesser und die Polydispersität arzneistofffreier und Coenzym Q10-haltiger Detergendsialyse-Vesikel (LK: 30 mg/ml)

□ Durchmesser ohne DCP —■— Polydispersität
▨ Durchmesser 5 Mol% DCP
▩ Durchmesser 10 Mol% DCP

Bei allen anderen dargestellten Präparationen beeinflusst der DCP-Zusatz die Homogenität kaum.

Ein 10%iger DCP-Zusatz zu Vesikeln aus SL war nicht möglich, da keine klare Mischmizellösung als Vorstufe für die Detergendsialyse herstellbar war.

1.3 Einfluß von inkorporiertem Cholesterol

Der Zusatz von Cholesterol übt entscheidenden Einfluß auf die Molekülordnung im Membranbilayer aus (30). Nach dem heutigen Kenntnisstand scheint für den stabilen liposomalen Einschluß wasserlöslicher Substanzen ein Einbau möglichst hoher Cholesterolkonzentrationen (bis zu 50%) in die Liposomenwand zumindest bei ungesättigten Lipiden unerlässlich zu sein (19). Untersuchungen zum Einfluß des Cholesterols auf den Einschluß lipophiler Arzneistoffe liegen hingegen kaum vor (30). Die folgende Untersuchung sollte hierzu einen Beitrag leisten: Es zeigte sich, daß über Detergensdialyse bei ungesättigtem SL 30 Mol% Cholesterol in die Vesikel eingebaut werden können, unabhängig vom Arzneistoffzusatz. Bei SLH-Vesikeln führten hingegen Cholesterolzusätze von über 10 Mol% nicht zu klaren Mischmizellösungen und konnten dadurch nicht verarbeitet werden.

In Abb. 5 sind die Ergebnisse der gelungenen Präparationsversuche zusammengefaßt:

Während der Zusatz von Cholesterol bei SL-Vesikeln zu einer minimalen Verringerung des Durchmessers unter leichter Erhöhung der Polydispersität führt, bewirkt Cholesterol bei den SLH-Vesikeln einen enormen Anstieg des Durchmessers. Mit einem Durchmesser von fast 300 nm und einer Polydispersität, die auf sehr breite Größenverteilung hinweist, wurde bei den arzneistofffreien SLH-Vesikeln das Ziel einer homogenen SUV-Präparation nicht erreicht. Mit zunehmendem Coenzym Q10-Gehalt werden die Vesikel jedoch kleiner und besitzen eine sehr gute Homogenität.

Bei 5 Mol% Coenzym Q10 ergibt sich durch den Cholesterolzusatz eine deutliche Verbesserung der Homogenität im Vergleich zum cholesterolfreien Ansatz. Diese Vesikel liegen mit einem Durchmesser von 114 nm nur noch knapp über der 100 nm-Grenze.

Ein nicht in die Abbildung einbezogener zusätzlicher DCP-Zusatz (5 Mol%) bei der arzneistoffhaltigen Präparation führte nicht zu einer Durchmesserverkleinerung, sondern hatte eine erhöhte Polydispersität zur Folge.

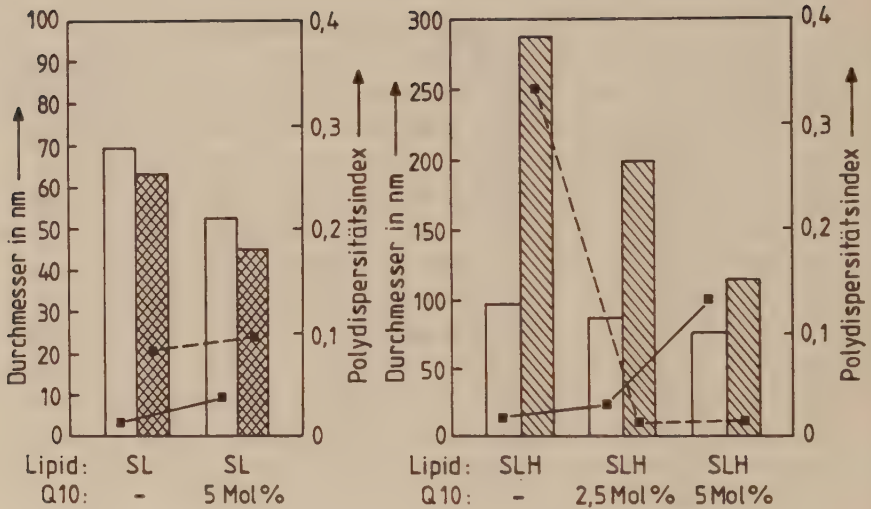


Abb. 5 Einfluß des Cholesteroleinbaus auf den mittleren Durchmesser und die Polydispersität arzneistofffreier und Coenzym Q10-haltiger Detergensiälyse-Vesikel (LK: 30 mg/ml)

- Durchmesser ohne Cholesterol
- ▨ Durchmesser 10% Mol% Cholesterol
- ▩ Durchmesser 30% Mol% Cholesterol
- Polydispersität ohne Cholesterol
- - ■ - - Polydispersität mit Cholesterol

1.4 Einfluß der Coenzym Q10-Konzentration

Die Gerüststruktur des Liposomenbilayers läßt nur einen begrenzten Einbau lipophiler Arzneistoffe zu (3).

Im folgenden wurde untersucht, wie sich der Einbau steigender Mengen an Coenzym Q10 bei einer gleichbleibenden Lipidkonzentration von 30 mg/ml auf die Eigenschaften von Detergensiälyse-Vesikeln verschiedener Lipidzusammensetzung auswirkt:

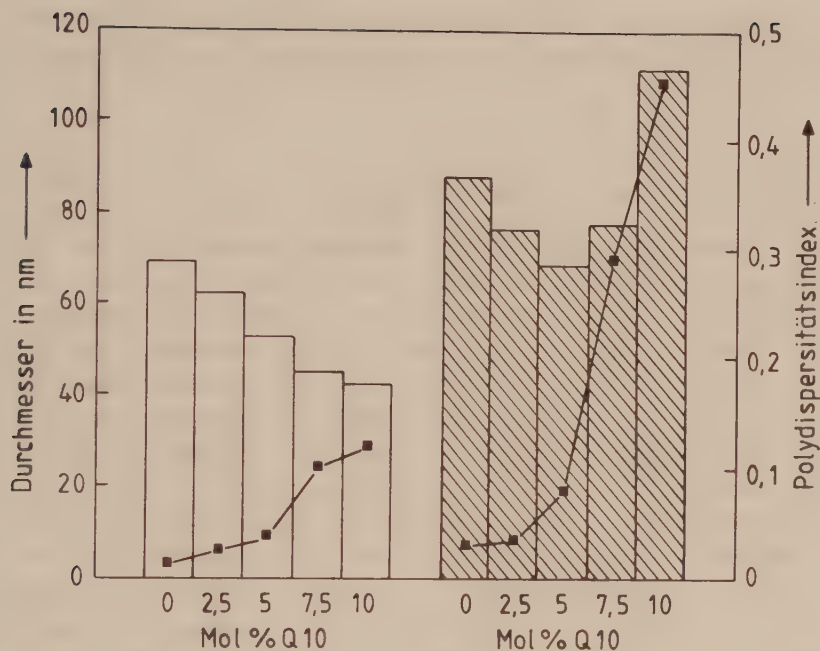


Abb. 6 Einfluß der Coenzym Q10-Konzentration auf den mittleren Durchmesser und die Polydispersität von Detergensdialyse-Vesikeln in Abhängigkeit von der Lipidart (LK: 30 mg/ml)

□ Durchmesser SL —■— Polydispersität
 ▨ Durchmesser SLH/DCP 10 + 0,5

Aus Abb. 6 geht hervor, daß bei einem Einbau von bis zu 5 Mol% Coenzym Q10 unabhängig von der Lipidart eine Verringerung des Vesikeldurchmessers bei gleichzeitiger leichter Polydispersitätszunahme zu beobachten ist. Auf höheren Coenzym Q10-Zusatz reagieren die Vesikel aus SLH/DCP wesentlich empfindlicher mit Polydispersitätszunahme als die SL-Vesikel, wobei der Vesikeldurchmesser wieder ansteigt.

Wird der Coenzym Q10-Zusatz auf 2,5 Mol% beschränkt, so sind die Vesikel aus hydriertem Lipid den Vesikeln aus ungesättigtem Sojalecithin hinsichtlich der Polydispersität ebenbürtig.

Nicht abgebildete SLH-Präparationen mit 2,5 Mol% Coenzym Q10 ohne DCP-Zusatz weisen die gleiche geringe Polydispersität auf.

1.5 Einfluß der Lipidkonzentration

Wie im vorhergehenden gezeigt, entstehen beim Einbau von Coenzym Q10-Konzentrationen über 5 Mol% Vesikel steigender Polydispersität, die für die parenterale Anwendung weniger geeignet erscheinen. Gelingt es jedoch, die Lipidkonzentration bei der Präparation zu erhöhen, so sollte eine höhere Arzneistoffkonzentration in der Dispersion ohne Überschreitung der homogen in den Bilayer inkorporierbaren Arzneistoffmenge erreichbar sein.

In Vorversuchen zeigte sich bei SLH, daß eine Verdopplung der Lipidkonzentration von 30 mg/ml auf 60 mg/ml sowohl mit als auch ohne Coenzym Q10-Zusatz zu äußerst inhomogenen Produkten führt. Deshalb wurden im folgenden - wie Abb. 7 zeigt - die Versuche auf eine Erhöhung der Lipidkonzentration um das 1,5-fache (45 mg/ml) beschränkt. Bei den Coenzym Q10-haltigen Proben wirkt sich die Erhöhung der Lipidkonzentration weder auf den Durchmesser noch auf die Polydispersität der Vesikel merklich aus. Es hat sich also in erster Linie die Zahl der Vesikel in der Dispersion erhöht.

Anders verhält es sich bei arzneistofffreien Vesikeln aus SLH/DCP. Hier führt bereits die Erhöhung der Lipidkonzentration auf das 1,5-fache zu einer Polydispersität, die auf eine polymodale Größenverteilung hinweist, einhergehend mit einer Verdopplung des mittleren Teilchendurchmessers.

Wie weitere nicht dargestellte Versuche zeigten, tritt dieses Phänomen bei arzneistofffreien Präparaten unabhängig vom DCP-Zusatz (0, 0,5 und 1 Mol%) und vom gewählten Lipid/Detergens-Verhältnis (0,8 und 1,0) auf.

Ebenfalls nicht dargestellt sind hochkonzentrierte SLH/DCP-Präparationen geringeren Arzneistoffgehaltes, die keine ver-

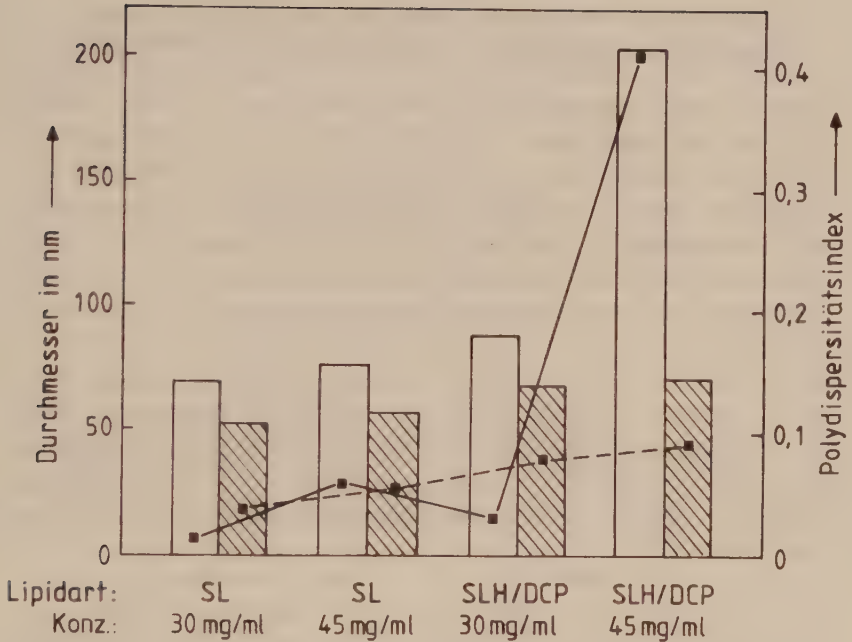


Abb. 7 Einfluß der Lipidkonzentration auf den mittleren Durchmesser und die Polydispersität arzneistofffreier und Coenzym Q10-haltiger Detergendsialyse-Vesikel (SLH/DCP = 10 + 0,5)

- Durchmesser arzneistofffrei
- ▨ Durchmesser 5 Mol% Q10
- Polydispersität arzneistofffrei
- - ■ - - Polydispersität 5 Mol% Q10

besserte Qualität im Vergleich zu den Zubereitungen mit 5 Mol% Coenzym Q10 aufwiesen.

1.6 Einfluß der Mischmizellgröße auf die bei der Detergendsdialyse entstehende Vesikelgröße

In den vorhergehenden Abschnitten dieses Kapitels wurde gezeigt, daß Veränderungen in der Rezeptur bei der Detergendsdialyse zu erheblichen Veränderungen im mittleren Vesikeldurchmesser führen können. In der Literatur wird beschrieben, daß Veränderungen in der Vesikelgröße durch unterschiedliches Lipid/Detergens-Verhältnis bei der Detergendsdialyse mit einer Veränderung der mischmizellaren Vesikelvorstufe korrelierbar sind (25).

An Hand einiger Beispiele sollte geprüft werden, ob die in unserer Untersuchung gefundenen Durchmesseränderungen ebenfalls bereits auf einen veränderten Mischmizelldurchmesser zurückzuführen sind, oder das veränderte Verhalten der Rezeptur sich erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Dialyse auswirkt.

In Abb. 8 ist der Durchmesser der Mischmizellen dem jeweils resultierenden Vesikeldurchmesser gegenübergestellt. Es läßt sich erkennen, daß die Vesikelvergrößerung, die durch Veränderung von Dispersionsmedium und durch Zusatz von Cholesterol zu SLH hervorgerufen wird, deutlich mit der Größe der Mischmizellen in Zusammenhang gebracht werden kann. Der Einfluß des Coenzym Q10-Zusatzes auf die Vesikelgröße der cholesterolhaltigen Zubereitung hingegen steht offensichtlich nicht mit dem Aufbau der dazugehörigen Mischmizellen in Verbindung. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den arzneistofffreien und den Coenzym Q10-haltigen Mischmizellen liegen innerhalb der Genauigkeit des Analysenverfahrens in diesem niedrigen Grenzbereich.

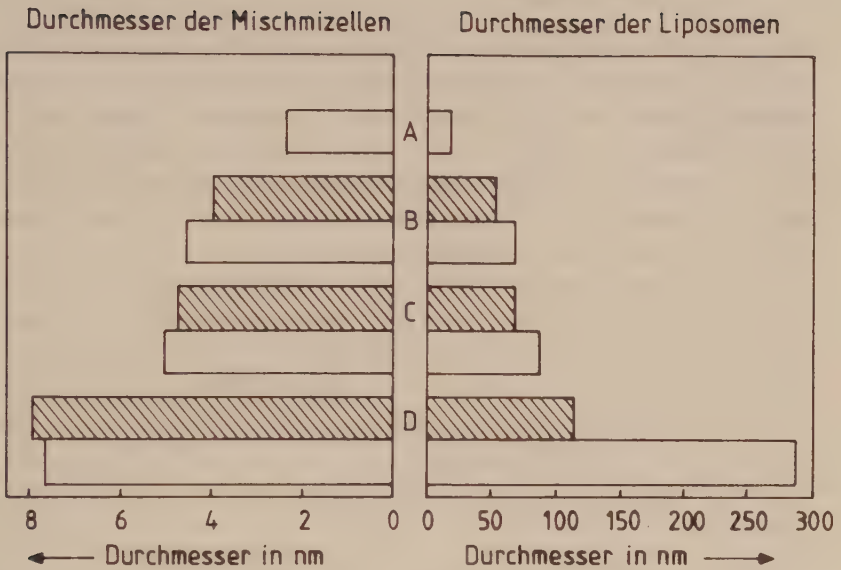


Abb. 8 Einfluß der Mischmizellgröße auf die bei der Detergensdialyse entstehende Vesikelgröße bei verschiedenen Rezepturen (LK: 30 mg/ml)

- A: SL isotonisiert mit Sorbit
B: SL isotonisiert mit NaCl
C: SLH/DCP 10 + 0,5 isotonisiert mit NaCl
D: SLH/Chol 10 + 1,0 isotonisiert mit NaCl

- arzneistofffrei
▨ 5 Mol% Coenzym Q10

1.7 Diskussion

Wie die Untersuchungsergebnisse zeigen, können bis zu 5 Mol% Coenzym Q10 in Vesikel verschiedener Lipidzusammensetzung eingebaut werden, ohne die Polydispersität wesentlich zu verschlechtern.

Die kleinsten Vesikel mit 20 nm Durchmesser erzielt man beim Einsatz ungesättigter Lipide in Kombination mit einem Dispersionsmittel geringer Ionenstärke.

Die homogensten arzneistoffhaltigen Präparationen mit einer Polydispersität, die der Qualität monodisperser Latexkugeln gleichkommt, erhält man bei einer Konzentration von 5 Mol% Coenzym Q10 unter Verwendung von ungesättigtem Lipid oder cholesterolhaltigem hydriertem Sojalecithin. Dabei sind die Vesikel aus ungesättigtem Lipid mit ca. 50 nm etwa halb so groß wie die cholesterolhaltigen SLH-Vesikel mit einem mittleren Durchmesser von 114 nm.

Coenzym Q10-haltige Vesikel mit einer Größe unter 100 nm und einer Polydispersität, die der oben beschriebenen Qualität entspricht, lassen sich aus cholesterolfreiem hydriertem Lipid herstellen, wenn der Coenzym Q10-Zusatz auf 2,5 Mol% beschränkt wird.

Der Arzneistoffeinsatz in SL- und SLH/DCP-Rezepturen kann bei unveränderter Vesikelqualität um das 1,5-fache gesteigert werden durch Erhöhung der Lecithinkonzentration von 30 mg/ml auf 45 mg/ml.

Solange bei dem Coenzym Q10-Einbau ein Gehalt von 5 Mol% nicht überschritten wird, hat dieser Zusatz einen mehr oder weniger stark verkleinernden Effekt auf die entstehenden Vesikeldurchmesser. Dieses Phänomen ist am stärksten ausgeprägt bei hochkonzentrierten SLH-Präparationen und bei SLH-Präparationen, die einen Cholesterolzusatz von 10 Mol% enthalten. In diesen beiden Fällen wird durch den Arzneistoff der mittlere Durchmesser um fast 300% reduziert, und anstelle einer breiten Größenverteilung entsteht eine Population einheitlicher Größe.

Auswirkungen der Lipidwahl auf die Vesikelqualität

Alle drei in unsere Untersuchung einbezogenen Lipide besitzen den in Abb. 9 dargestellten Phosphatidylcholinaufbau. Wie jedoch aus Tab. 1 hervorgeht, unterscheiden sich die Alkylreste R der Fettsäuren des jeweiligen Lipids sowohl in der Kettenlänge als auch in der Zahl der Doppelbindungen.

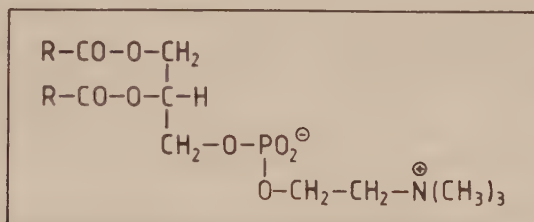


Abb. 9 Aufbau des Phosphatidylcholinmoleküls (R = Alkylrest)

Fettsäurerest	Anteil an Gesamtfettsäureresten (%)		
	SL	EL	SLH
C16 : 0	18	46	17
C18 : 0	4	13	83
C18 : 1	35	18	-
C18 : 2	17	8	-
C18 : 3	5	4	-
C20 : 4	-	10	-
Phasenübergangstemperatur in °C	SL -30 bis -20	EL -15 bis -5	SLH 53,5

Tab. 1 Fettsäurezusammensetzung und Phasenübergangstemperatur der verwendeten Phosphatidylcholone (16,20,31)

Ein hoher Anteil ungesättigter Fettsäurereste macht bei der Liposomenpräparation und -lagerung Stabilisierungsmaßnahmen gegen Autoxidationsprozesse notwendig (32). Von diesem Gesichtspunkt aus gesehen, ist bei der Entwicklung eines pharmazeutischen Liposomenpräparates dem hydrierten SLH der Vorzug zu geben.

Der Anteil ungesättigter Fettsäurereste wirkt sich weiterhin auf die Phasenübergangstemperatur der wäßrig dispergierten liposomalen Bilayerstrukturen aus. Oberhalb dieser Temperatur liegen die Fettsäureketten der Struktur in einer beweglichen, relativ ungeordneten Form vor, die als flüssigkristalliner Zustand bezeichnet wird. Wird die Phasenübergangstemperatur unterschritten, so lagern sich die Fettsäureketten regelmäßiger und dichter zusammen in Form der sogenannten lamellaren Gelphase (2,33).

Die Präparation der Liposomen muß oberhalb der Phasenübergangstemperatur ausgeführt werden (25), die für die untersuchten Lipide in Tab. 1 aufgeführt ist. Während die Liposomenpräparation mit den ungesättigten Lipiden bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann, muß bei SLH eine Temperaturbelastung des zu inkorporierenden Wirkstoffs mit mindestens 54°C in Kauf genommen werden.

Sowohl bei Kühlschranks- und Raum- als auch bei Körpertemperatur liegen die SLH-Vesikel im Gegensatz zu den SL- und EL-Vesikeln im regelmäßigen, kompakten Gelzustand vor. Die Beobachtung, daß sich der Einbau steigender Mengen an Coenzym Q10 auf die Qualität der SL- und EL-Vesikel weniger stark auswirkt als auf die Qualität der SLH-Vesikel, könnte mit der beweglicheren Struktur der SL-Membran in Zusammenhang gebracht werden, die den Einbau des sperrigen Coenzym Q10-Moleküls eher zuläßt.

Die Auswirkung des Einbaus von Cholesterol in Vesikelmembranen hängt ebenfalls von der Phasenübergangstemperatur des verwendeten Lipids ab. Während Cholesterol oberhalb der Phasenübergangstemperatur membranverfestigend wirkt, übt es auf Bilayer im lamellaren Gelzustand einen membranverflüssigenden Einfluß aus (30). Dieser Einfluß könnte ein Grund dafür sein, daß der Cholesterolzusatz bei SLH-Vesikeln mit 5 Mol% Coenzym Q10

eine Verbesserung der Polydispersität im Vergleich zum cholesterolfreien Präparat zu Folge hat.

Der Umstand, daß sich ein lipophiler Arzneistoff eher in Membranen hoher Fluidität einbauen läßt, steht im Gegensatz zum Verhalten wasserlöslicher Arzneistoffe, für die eine möglichst starre und dadurch impermeable Membran beim Einschluß gewählt werden muß.

Zusammenhänge dieser Art sind bis jetzt kaum untersucht worden. Ein ähnlicher Befund ergab sich in der Literatur beim Einschluß des apolaren Vinblastins in multilamellare Vesikel, was die Affinität des Vinblastins zu unterschiedlichem Lipidmaterial betrifft (23).

Gründe für die Entstehung unterschiedlicher Vesikeldurchmesser

Auf der Suche nach Gründen für die entstandenen unterschiedlichen Vesikeldurchmesser bei der Detergensdialyse konnte ein geringerer Mischmizellendurchmesser für sorbithaltige Präparationen im Vergleich zu den NaCl-haltigen Proben festgestellt werden.

Beim Austausch von NaCl gegen Sorbit müßte sich nach (34) die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) des Cholats erhöhen unter gleichzeitiger Erniedrigung der Aggregationszahl der Cholatmizellen. Da sich die Lipide im sorbithaltigen System mit Hilfe des Cholates sehr rasch mischmizellar solubilisieren ließen, kann davon ausgegangen werden, daß die Cholatkonzentration trotz der geringen Konzentration an Natrium-Ionen weit oberhalb der CMC lag. In diesem Fall kann ein Gleichgewicht zwischen reinen Cholatmizellen und Lipid/Cholat-Mizellen vorliegen (35). Eine verminderte Aggregationszahl der Cholatmizellen könnte dabei die von uns gemessene Verkleinerung der gemischten Mizellen zur Folge haben.

Der bei fast allen Zubereitungen gefundene Effekt des Coenzym Q10, den Vesikeldurchmesser zu verkleinern, ist nicht über die Mischmizellbildung erklärbar. Ein ähnlicher durchmessererklari-

nernder Effekt ist bei der Detergendsialyse bisher nicht beschrieben worden.

Erst der Arzneistoffzusatz macht die Herstellung homogener Vesikel unter 100 nm bei einer Lipidkonzentration von 45 mg/ml möglich. Probleme bei der Verarbeitung hoher SLH-Konzentrationen über Detergendsialyse, wie sie auch in der Literatur (20) beschrieben sind (50 mg SLH pro ml), sind also eventuell durch den Zusatz geeigneter lipophiler Substanzen behebbar.

Ein denkbarer Grund für diese Coenzym Q10-Wirkung könnte im membranfluidisierenden Effekt gesehen werden, den Coenzym Q10 auf die mitochondriale Membran (36) und damit eventuell auch auf den liposomalen Bilayer ausübt. Dieser Effekt könnte bei der Vesikelbildung aus wachsenden Bilayerscheiben die Energie vermindern, die nach Modellvorstellungen (37) zur Krümmung der Scheibe bis hin zur Hohlkugel erforderlich ist.

2. Einfluß der Herstellungsmethode auf den mittleren Durchmesser und die Homogenität von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV)

Wird die Vielzahl publizierter Liposomenherstellungsmethoden beurteilt nach der Möglichkeit der Herstellung konzentrierter SUV-Dispersionen ohne Begrenzung auf bestimmtes Lipidmaterial, so verbleiben neben der Detergendsdialyse-Methode praktisch nur noch 2 Verfahrensarten - die Beschallung von MLV (38) und die Hochdruckextrusion durch Düsen (39,40) oder Membranporen (41). Wegen ihres relativ geringen apparativen und zeitlichen Aufwandes hat die Beschallungsmethode die weitaus häufigste Verbreitung zur SUV-Herstellung gefunden, obwohl sie im Gegensatz zu den beiden anderen Verfahrensarten nicht für Ansätze geeignet ist, die über den Labormaßstab hinausgehen (42).

Um die resultierende Vesikelqualität bei den drei Methoden zu vergleichen, sowie um zu überprüfen, ob die Hochdruckdüsenhomogenisierung im Hinblick auf die Produktion großer Chargen eine Alternative zur Detergendsdialyse darstellt, wurden einige ausgewählte Rezepturen auf SLH-Basis mit allen drei Verfahren hergestellt. Die Hochdruckdüsenhomogenisierung wurde dabei mit dem Microfluidizer-Gerät (40) durchgeführt.

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist der Cholesteroleinbau bei Detergendsdialyse-Vesikeln aus SLH auf 10 Mol% beschränkt. Die maximale Plasmastabilität wird jedoch bei 50 Mol% Cholesterol erreicht (19). Deshalb war die zweite Fragestellung innerhalb des Methodenvergleichs, ob sich die Beschallung und die Hochdruckdüsenhomogenisierung zur Herstellung Coenzym Q10-haltiger SLH-Vesikel mit hohem Cholesterolanteil eignen.

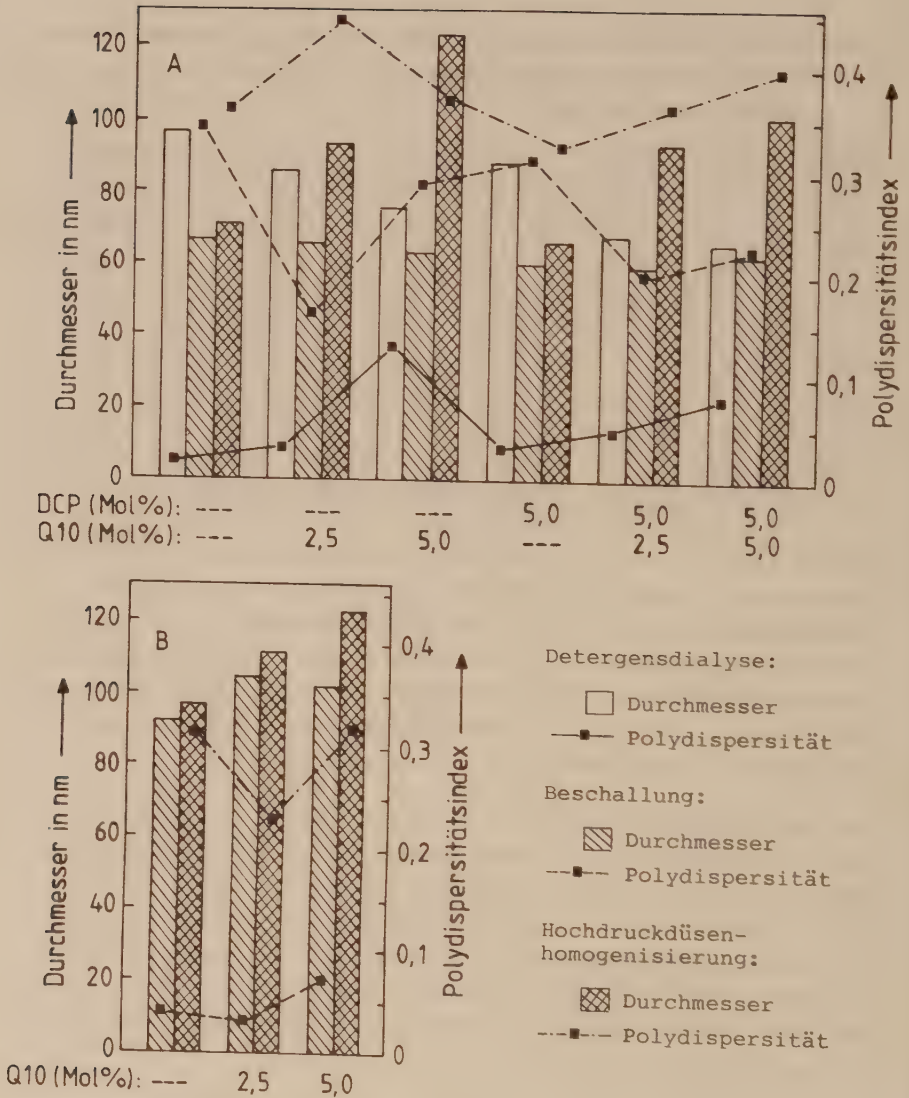


Abb. 10 Einfluß des Herstellungsverfahrens auf den mittleren Durchmesser und die Polydispersität von cholesterolfreien und cholesterolphaltigen Vesikeln (LK: 30 mg/ml)

A: Vesikel aus SLH mit unterschiedlichem Ladungsträger- und Coenzym Q10-Gehalt

B: Vesikel aus SLH/Chol (5+5) mit unterschiedlichem Coenzym Q10-Gehalt

2.1 Cholesterolfreie Vesikel

In die Prüfung wurden Präparationen unterschiedlichen Coenzym Q10-Gehalts mit und ohne DCP-Zusatz einbezogen. Die mittleren Vesikeldurchmesser und Polydispersitäten dieser Präparationen sind in Abb. 10A wiedergegeben. Die kleinsten Vesikeldurchmesser mit Werten zwischen 60 und 70 nm liefert die Beschallungsmethode, unabhängig vom Coenzym Q10- und DCP-Gehalt.

Während ein steigender Coenzym Q10-Gehalt bei der Detergendsdialyse zu einer Verkleinerung des Vesikeldurchmessers führt, steigt der Durchmesser bei den düsenhomogenisierten Präparaten mit steigendem Coenzym Q10-Gehalt an. Die Detergendsdialyse-Vesikel besitzen mit Abstand die schmalste Größenverteilung, während bei dem hohen Polydispersitätsindex der düsenhomogenisierten Vesikel von einer polymodalen Verteilung ausgegangen werden muß.

2.2 Cholesterolhaltige Vesikel

Abb. 10B zeigt die Ergebnisse der Herstellung von SLH/Cholesterol-Vesikeln (5 + 5) über Beschallung und Hochdruckdüsenhomogenisierung. Besonders für die beschallten Vesikel fällt bei einem Vergleich mit den Präparationen in Abb. 10A eine Zunahme des Vesikeldurchmessers, bedingt durch den Cholesteroleinbau, auf.

Während bei den düsenhomogenisierten Präparaten der Cholesteroleinbau nur eine geringfügige Verbesserung der Polydispersität mit sich bringt, führt bei den beschallten Vesikeln der Cholesterolzusatz zu einer sehr guten Homogenität. Hinsichtlich der Homogenität sind die cholesterolhaltigen beschallten Vesikel den cholesterolfreien Detergendsdialyse-Vesikeln aus Abb. 10A ebenbürtig, wenngleich die arzneistoffhaltigen Detergendsdialyse-Vesikel einen geringeren mittleren Durchmesser aufweisen.

2.3 Diskussion

Um bei der Beschallungsmethode eine ausreichende Übertragung der Ultraschallenergie zu gewährleisten, empfiehlt es sich, mit einem in die Dispersion eintauchenden Titanrüssel zu arbeiten anstatt mit einem Ultraschallbad (3,43).

Der Titanrüssel zeigt einen Abrieb von feindispersen Titanpartikeln, der nach der Präparation entfernt werden muß. Ebenso muß ein Anteil verbleibender MLV durch Zentrifugation (38), Membranfiltration (20) oder Gelfiltration (14) abgetrennt werden.

Bei dieser Aufreinigung, die nach unseren Vorversuchen am besten durch eine Zentrifugation bei ca. 100 000 g erfolgt, ist allerdings mit Lipid- und Arzneistoffverlust zu rechnen.

Für die Hochdruckdüsenhomogenisierung im Microfluidizer-Gerät ist in der Literatur nicht die Notwendigkeit eines Aufreinigungsschrittes beschrieben, so daß die Präparationen im lediglich membranfiltrierten Zustand vermessen wurden (40). Möglicherweise hätte eine Aufarbeitung über Zentrifugation, wie sie bei einfacheren Homogenisierungsgeräten (39,43) beschrieben ist, zu besserer Vesikelqualität geführt. Soll das Verfahren jedoch zu einer kontinuierlichen Produktion in größerem Maßstab führen, so stellt ein Zentrifugationsschritt, der bei der Detergendsialyse nicht erforderlich ist, eine Einschränkung dar.

Der Vorteil, den die Beschallung gegenüber der Detergendsialyse bei der hier vorliegenden Problemstellung bietet, besteht in der Möglichkeit, im Labormaßstab homogene Coenzym Q10-haltige Vesikel mit höherem Cholesterolanteil zu produzieren. Die Beobachtung, daß der Durchmesser der beschallten Vesikel bei Cholesterolzusatz ansteigt, ist auch in anderen Untersuchungen zu finden (20,44). Sie wird darauf zurückgeführt, daß der membranstabilisierende Effekt des Cholesterols die Desintegration der MLV durch Ultraschall erschwert.

In die Untersuchung wurden keine Präparationen aus ungesättigtem Lipid einbezogen, da die Unterdrückung der Autoxidations-

prozesse während der Herstellung vor allem bei der Beschallungsmethode Probleme bereitet (45). Neben der katalysierenden Wirkung des Ultraschalls tritt als beschleunigender Faktor eine lokale Erwärmung des Produktes auf. Schlecht abführbare Erwärmung des Produktes während der Herstellung wurde von uns auch bei der Microfluidizer-Methode beobachtet. Die Temperierung bei der Detergentsdialyse bereitet hingegen keine Probleme.

II. Vergleichende Untersuchungen zur Charakterisierung der Vesikelpräparate

1. Gelpermeationschromatographie und Elektronenmikroskopie

Um die durch Dynamisches Laser-Light-Scattering erhaltenen Ergebnisse der Vesikelcharakterisierung über andere Meßmethoden abzusichern und um zusätzliche Aussagen zur Vesikelqualität zu erhalten, wurde jeweils eine Auswahl an Detergentsdialyse-Liposomen gelchromatographisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

1.1 Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie erfolgt im Idealfall eine Auftrennung der chromatographierten Probe rein nach der Partikelgröße der Bestandteile derart, daß größere Vesikel schneller eluiert werden als kleinere, denen das innere Porenvolumen des Gelmateri als in größerem Ausmaß zur Diffusion zur Verfügung steht. Vesikel, deren Größe eine für das jeweilige Gel charakteristische Ausschlußgrenze überschreiten, werden in der gleichen Fraktion (V_0) eluiert. Ebenso erscheinen alle Partikel, die durch ihren geringen Durchmesser das gesamte Porenvolumen des Gels durchdringen, in einer Fraktion (V_t). Neben der qualitativen Interpretation der für die Vesikel erhaltenen Elutionsprofile kann eine Bestimmung des Vesikeldurchmessers erfolgen, wenn die Chromatographiesäule mit Partikeln bekannter Größe geeicht wird (38,46,47).

Im Gegensatz zur präparativen Vesikelaufreinigung mittels Gelchromatographie konnte sich die gelchromatographische Vesikelcharakterisierung bisher nicht allgemein durchsetzen, trotz des relativ geringen apparativen Aufwands.

Die in den Anfängen der Liposomenforschung zur Charakterisierung eingesetzten Sepharosegele (38,47) besitzen eine sehr geringe mechanische und chemische Stabilität sowie eine zu niedrige Ausschlußgrenze (ca. 60 nm). Sie wurden deshalb neuer-

dings durch halbsynthetische Materialien - beispielsweise Sephacryl S-1000 - abgelöst (46). Die halbsynthetischen Gele weisen eine bessere chemische und mechanische Stabilität, geringeres Adsorptionsverhalten gegenüber Phospholipiden und eine höhere Ausschußgrenze von ca. 260 - 300 nm auf (46,47).

Neben der Charakterisierung der Detergensdialyse-Vesikel mit dem bereits eingeführten halbsynthetischen Sephacryl S-1000-Material war es das Ziel unserer gelchromatographischen Untersuchungen, zu überprüfen, inwieweit das bisher zur Liposomencharakterisierung noch nicht eingesetzte vollsynthetische Gelmaterial Fractogel TSK HW-75 Vorteile bietet.

Kalibrierung

Mit beiden Materialien wurden Säulen gepackt. Wegen der höheren mechanischen Stabilität des vollsynthetischen Materials konnte die Fractogelsäule mit dem doppelten Packfluß gepackt werden, so daß in der halben Zeit ein kompakteres Gelbett erreicht wurde. Der höhere Packfluß würde auch einen höheren Elutionsfluß erlauben als die Sephacryl S-1000-Säule, worauf jedoch aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Säulen verzichtet wurde (48,49).

Anschließend erfolgte die Bestimmung des Elutionsparameters K_d von globulären Partikeln bekannter Größe. Die Auswertungsmethode nach ACKERS (50) stellt über die Funktion $\text{inv}(\text{erf}(1-K_d))$ eine lineare Beziehung zwischen dem Durchmesser des Partikels und seinem Elutionsvolumen her.

Das Ergebnis der beiden Säulenkalibrierungen in Abb. 11 zeigt, daß sich auch mit Fractogel TSK HW-75 ein linearer Zusammenhang nach ACKERS ergibt. Der steilere Verlauf der Geraden deutet auf eine etwas höhere Ausschußgrenze als bei Sephacryl S-1000 hin. Da für Werte über 1 bei $\text{inv}(\text{erf}(1-K_d))$ die Auswertungsmethode ungenau wird (siehe experimenteller Teil), müßte bei Fractogel TSK HW-75 im Bereich von ca. 180 nm bis 230 nm eine genauere Größenbestimmung möglich sein.

Bei der Chromatographie verschiedener Vesikelpräparationen zeigte sich, daß arzneistofffreie Präparationen sich unabhän-

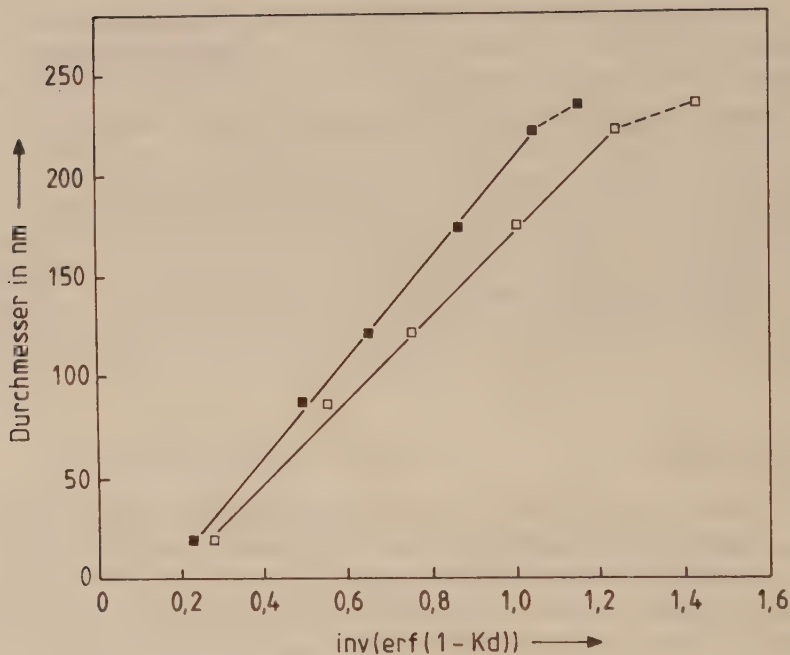


Abb. 11 Eichgeraden zur Bestimmung des Durchmessers von Liposomen mittels Gelchromatographie (Kalibrierung mit Eichlatices und Thyroglobulin)

- Fractogel TSK HW-75
- Sephacryl S-1000

gig von der Lipidzusammensetzung an beiden Gelen bei 20°C auftrennen lassen. Bei Coenzym Q10-haltigen Präparationen trifft diese Aussage nur für die ungesättigten Lipide uneingeschränkt zu. Arzneistoffhaltige SLH-Präparationen ohne DCP-Zusatz zeigen an beiden Gelen starke Adsorptionerscheinungen und wurden dadurch unvollständig und retardiert eluiert. DCP-haltige Coenzym Q10-Vesikel aus SLH lassen sich an Sephacryl S-1000 ohne Adsorptionerscheinungen chromatographieren.

Die Ergebnisse der Vesikeldurchmesserbestimmung über die Eichkurven aus Abb. 11, die bei beiden Gelen sehr gut mit den DLLS-Ergebnissen übereinstimmen, werden weiter unten vorgestellt.

Auswertung der Elutionsprofile

Die Auswertung der Elutionsprofile von Vesikelpräparationen kann Aufschluß darüber geben, ob sich der mittlere Durchmesser bei breiten Größenverteilungen aus mehreren Populationen unterschiedlicher Größe zusammensetzt, die auf der Säule aufgetrennt werden. Die Erkennung von Populationen unterschiedlicher Größe in einer Probe kann bei DLLS-Messungen über komplizierte Auswertungsprogramme erfolgen. Deren Ergebnisse können jedoch in Abhängigkeit vom jeweiligen Verhalten der Probe mit Fehlern behaftet sein (28,51).

Aus diesem Grund war es interessant, bei Proben unterschiedlicher Polydispersität die Größenverteilung laut Elutionsprofil mit dem jeweiligen Histogramm zu vergleichen, das die computergesteuerte Auswertung der DLLS-Messungen ergibt.

Abb. 12A-D stellt bei SLH/DCP-Vesikeln unterschiedlicher Lipidkonzentration, deren unterschiedlicher Polydispersitätsindex auf verschieden breite Größenverteilung hinweist, das Elutionsprofil dem Histogramm gegenüber. Beide Methoden kommen zum gleichen Ergebnis: Die Erhöhung der Lipidkonzentration hat keine generelle Vergrößerung des Vesikeldurchmessers mit einer breiteren Gaußschen Verteilung zur Folge, sondern es entsteht neben einer Population geringfügig erhöhten Durchmessers ein Anteil sehr großer Vesikel, die teilweise das Ausschlußvolumen des Gels überschreiten.

Für Vesikel bis zu einem Polydispersitätsindex von ca. 0,15 zeigte das jeweilige Elutionsprofil an beiden Gelen nur einen Peak, wodurch der Zusammenhang zwischen niedrigem Polydispersitätsindex und homogener Probe bestätigt wird.

Auch die sorbithaltigen Dispersionen, für die nach dem DLLS-Verfahren bei einem Durchmesser von ca. 20 nm ein Polydispersitätsindex von 0,2 bestimmt worden ist, wurden als einheitlicher Peak eluiert (Diagramm siehe experimenteller Teil).

Bei SLH-Proben mit mehr als 5 Mol% Coenzym Q10 erschien jeweils ein Anteil im Ausschlußvolumen.

1.2 Elektronenmikroskopie

Die Betrachtung von Strukturen unter dem Elektronenmikroskop erfolgt im Hochvakuum und erfordert daher trockene Präparate. Um im trockenen Präparat die ursprüngliche Vesikelform und Größe annähernd wiederzugeben, wird neben der Gefrierbruch- und der Gefrierätztechnik vor allem das Verfahren der Negativkontrastierung angewandt (3).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäurelösung durchgeführt. Die "elektronendichte" Phosphorwolframsäure fixiert die Bilayerstrukturen auf einer Folie und läßt die getrockneten Vesikel im Bild hell auf dunklem Grund erscheinen (52,53). Da aus der ursprünglichen Hohlkugel im trockenen Präparat eine flache kollabierte Scheibe größeren Durchmessers entsteht, wird von manchen Autoren (54) der auf dem Bild gemessene Durchmesser um den Faktor 0,75 verringert.

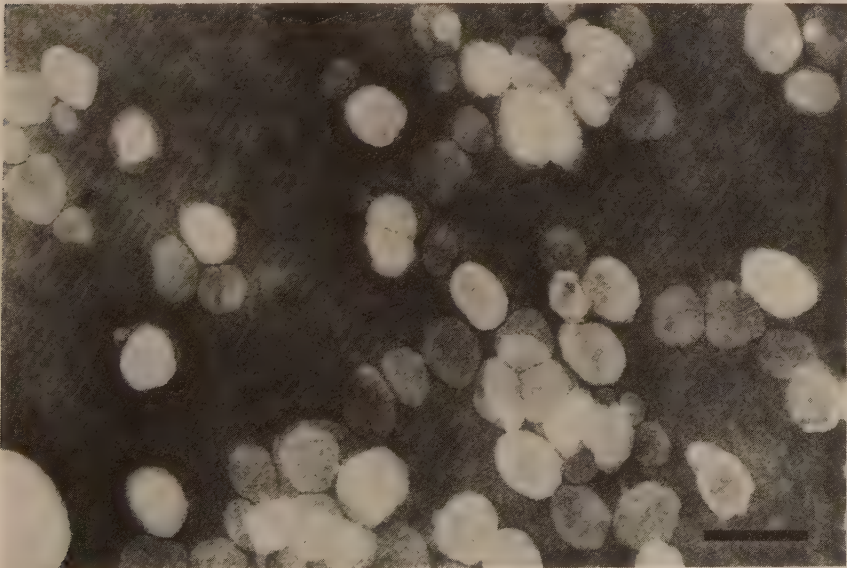


Abb. 13 Elektronenmikroskopische Abbildung von Detergensdialyse-Vesikeln mittels Negativkontrastierung
Rezeptur: SL/DCP/Q10 (10 + 0,5 + 0,5; LK: 30 mg/ml)
Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 100 nm

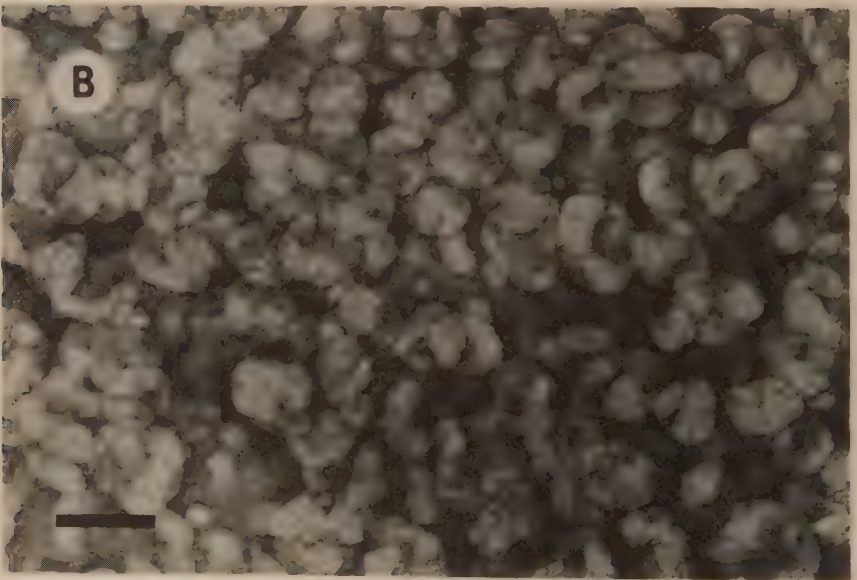


Abb. 14 Elektronenmikroskopische Abbildung von Detergens-
dialyse-Vesikeln mittels Negativkontrastierung
A: SLH/DCP/Q10 ($10 + 0,5 + 0,25$; LK: 30 mg/ml)
B: SLH/DCP/Q10 ($10 + 0,5 + 0,5$; LK: 30 mg/ml)
Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 100 nm

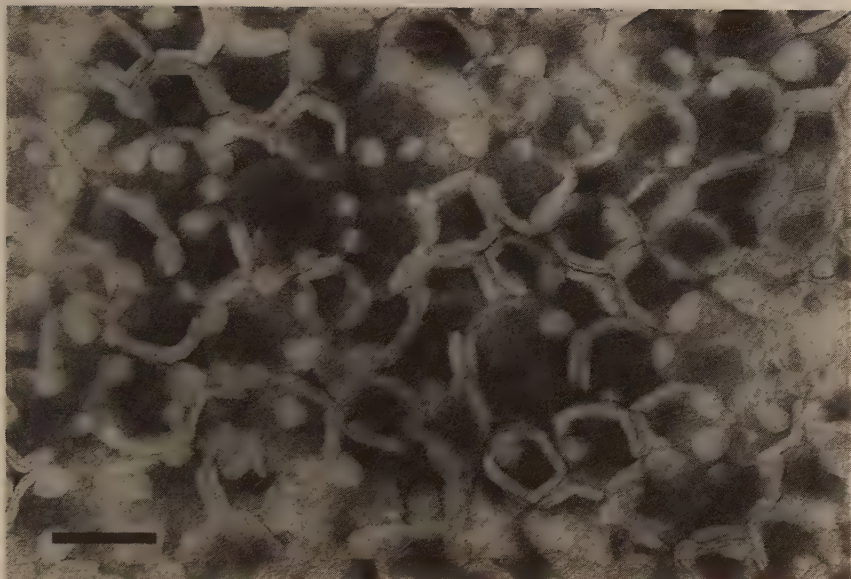


Abb. 15 Elektronenmikroskopische Abbildung von Detergensdialyse-Vesikeln mittels Negativkontrastierung
Rezeptur: SL/DCP (10 + 0,5; LK: 30 mg/ml)
Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 100 nm

Abb. 13 bis 16 zeigen Ausschnitte aus den zur Durchmesserbestimmung verwendeten Aufnahmen verschiedener Vesikelpräparationen. Die in Abb. 13 und 14 wiedergegebenen Coenzym Q10-haltigen Rezepturen ließen sich gut präparieren. Sie weisen jeweils eine Größenhomogenität auf, die den durch DLLS gemessenen niedrigen Polydispersitätsindex bestätigt. Eine Erhöhung des Coenzym Q10-Anteils bei SLH/DCP-Vesikeln äußert sich entsprechend den DLLS-Messungen in einer Verringerung des Vesikeldurchmessers, wie aus einem Vergleich von Abb. 14A und B hervorgeht.

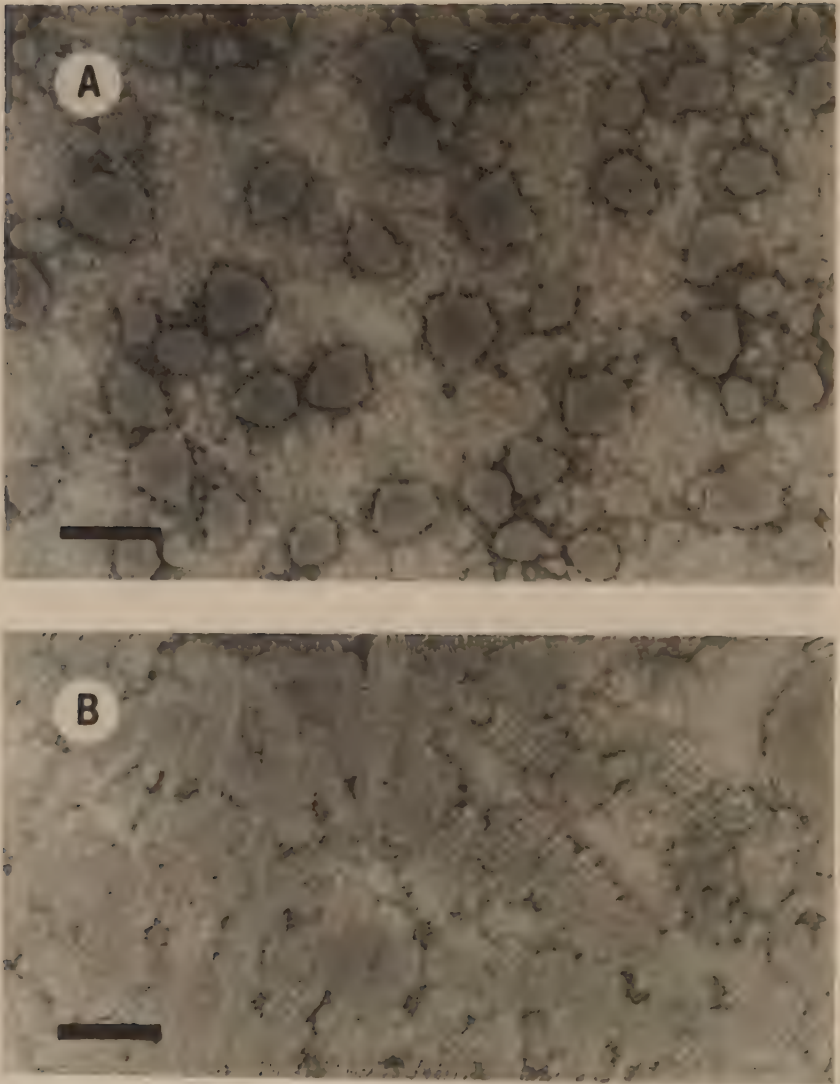


Abb. 16 Elektronenmikroskopische Abbildung von Detergensdialyse-Vesikeln mittels Negativkontrastierung nach zwei verschiedenen Verfahren
Rezeptur: EL (LK: 30 mg/ml; isotoniert mit Sorbit)
A: Verfahren I (siehe experimenteller Teil)
B: Verfahren II (siehe experimenteller Teil)
Länge des eingezeichneten Balkens entspricht 100 nm

Die arzneistofffreien Präparate in Abb. 15 und 16B neigen zur Aggregation im kollabierten Zustand, wobei sich die Scheibenebene senkrecht zur Bildebene aufstellt. Bei den SLH-Vesikeln in Abb. 15 findet nur eine geringfügige Aggregation statt, so daß noch diskrete Vesikel erkennbar sind. Die Länge der gekrümmten Linien entspricht dabei dem Durchmesser der aufgestellten gebogenen Scheiben (53). Bei den arzneistofffreien EL-Vesikeln aus sorbithaltigem Dispersionsmedium hingegen (Abb. 16B), deren Durchmesser gemäß Dynamischem Laser-Light-Scattering ca. 20 nm betragen sollte, läßt sich nur noch erkennen, daß lamellare Strukturen zugegen sind, die offensichtlich während der Kontrastierung zu größeren Gebilden fusionierten. In Abb. 16A wurden die Vesikel in verdünnter Form ange-trocknet, bevor eine Nachkontrastierung mit Phosphorwolframsäure erfolgte. Neben kleineren Strukturen sind jedoch auch hier größere Gebilde sichtbar, bei denen es sich um Artefakte handeln könnte.

1.3 Vergleich der Ergebnisse der Bestimmung des mittleren Vesikeldurchmessers über Gelchromatographie, Elektronenmikroskopie und Dynamisches Laser-Light-Scattering

In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Durchmesserbestimmung über die verschiedenen Methoden einander gegenübergestellt.

Sowohl bei den Ergebnissen der beiden Gelmaterialien untereinander als auch bei dem Vergleich der gelchromatographischen Ergebnisse mit den Ergebnissen aus DLLS ist Übereinstimmung zu finden. Erwartungsgemäß liefert die direkte Vermessung der abgebildeten kollabierten Scheiben bei der Elektronenmikroskopie größere Durchmesser. Wird über den Faktor 0,75 von der Scheibe auf die Hohlkugel zurückgerechnet, so ergeben sich niedrigere Werte als bei den beiden anderen Methoden, abgesehen von dem merklich erhöhten Durchmesserwert für die EL-Vesikel in sorbithaltigem Medium. Da die elektronenmikroskopische Durchmesserbestimmung nur einer orientierenden Bewertung im Vergleich zu den anderen Methoden dienen sollte, wurde die Vermessung

jeweils auf eine verhältnismäßig kleine Zahl an Einzelabbildungen beschränkt.

Rezeptur (LK: 30 mg/ml)	DLLS	Gelchromatographie		Elektronenmikr. +)	
		A	B	direkt	x0,75
SLH	97	98	99		
SLH/DCP 10 + 0,5	88	89	89	105 ±27	79 ±20
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,25	77			86 ±13	65 ±10
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5	69	64		74 ±10	55 ± 7
SLH/DCP/Q10 10 + 1,0 + 0,5	66	60			
EL	72	60	66		
SL/Q10 10 + 0,5	53	48	57		
SL/DCP/Q10	51	50		58 ± 9	44 ± 7
SL*)	17	23			
EL*)	16			40 ±15	30 ±12
SL/Q10*) 10 + 0,5	15	23			

Tab. 2 Vergleich der Ergebnisse verschiedener Vesikelgrößen-Bestimmungsmethoden (Durchmesser in nm)

A = Sephacryl S-1000

B = Fractogel TSK HW-75

+) jeweils 20 bis 32 Teilchen wurden ausgemessen

*) Dispersionsmedium mit Sorbit isotonisiert

Bei Proben schmaler Größenverteilung entspricht der Polydispersitätsindex der DLLS-Messungen näherungsweise der durchmessergewichteten Varianz der Verteilung (28). Damit kann beispielsweise für die SLH/DCP-Vesikel mit 2,5 Mol% Coenzym Q10 eine Standardabweichung des Durchmessers von ± 14 nm berechnet werden. Die Größenordnung dieser Schwankung entspricht der Schwankung der elektronenmikroskopisch bestimmten Teilchendurchmesser.

1.4 Diskussion der Ergebnisse

Beurteilung der Gelchromatographie

Im Gegensatz zur computergesteuerten DLLS-Messung erfordern gelchromatographische und elektronenmikroskopische Messungen einen wesentlich größeren Zeitaufwand. Vom apparativen Aufwand her gesehen stellt jedoch die Gelchromatographie mit Abstand das einfachste Verfahren dar.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß bei Vesikeln, deren Bestandteile nicht am Gelmaterial adsorbieren, eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den gelchromatographischen Ergebnissen und den Ergebnissen der beiden anderen Methoden festzustellen ist. Bei monomodal verteilten Proben erlaubt der Polydispersitätsindex des DLLS allerdings empfindlichere Qualitätsunterscheidungen.

Der Einsatz des vollsynthetischen Fractogel TSK HW-75 zur Vesikelcharakterisierung oder Aufreinigung kann bei Vesikeln geeigneter Zusammensetzung gegenüber dem Einsatz halbsynthetischer Gele Vorteile bieten:

- o Der höhere Packdruck läßt höhere Flußraten zu (48,49).
- o Im Gegensatz zu anderen neuartigen Gelen mit hoher Flußrate (55) kann das Gel mit Eichlatizes und globulären Proteinen anstatt Vesikeln exakt kalibriert werden, wodurch die Methode an Unabhängigkeit gewinnt.

- o Die höhere Ausschlußgrenze erweitert den Trennbereich für größere Vesikel.
- o Die erhöhte chemische und mechanische Stabilität erlaubt eine bessere Reinigung der gepackten Säule.

Ergebnisse der Durchmesserbestimmung

Beim Vergleich der Durchmesserbestimmung über die verschiedenen Methoden muß im allgemeinen berücksichtigt werden, daß beim DLLS-Verfahren die Hydrathülle der Vesikel mit in die Bestimmung eingeht, während die elektronenmikroskopischen Aufnahmen den dehydratisierten Zustand zeigen. Da die Hydrathülle den mittleren Durchmesser jedoch nur um 1,2 nm vergrößert (56), kann in unserer Betrachtung dieser Gesichtspunkt vernachlässigt werden.

Von besonderer Bedeutung ist die vergleichende Charakterisierung bei den Partikeln aus ungesättigtem Lipid in sorbithaltigem Dispersionsmedium, deren mittlerer Durchmesser laut DLLS zwischen 15 und 17 nm liegt - bei einem Polydispersitätsindex mittlerer Qualität (ca. 0,2).

In der Literatur wurden über Detergensdialyse bei ähnlicher Rezeptur (+30 Mol% Cholesterol) größere Partikel höherer Polydispersität erreicht (ϕ 38 nm, Polydispersität > 0,3) und die Vermutung einer unvollständigen Liposomenbildung in Sorbitlösung geäußert (20).

Die Tatsache, daß in unserer Untersuchung die gelchromatographisch bestimmten Durchmesser ähnlich niedrig liegen (Elutionsprofil siehe experimenteller Teil) wie die über DLLS ermittelten Werte, spricht für das Vorliegen sehr kleiner Partikel. Daß es sich dabei um Bilayerstrukturen handelt, legen die aggregierten lamellaren Strukturen der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 16B) nahe. Die Probleme bei der Präparierung für die Elektronenmikroskopie könnten auf eine starke elektrostatische Wechselwirkung der Phosphorwolframsäure mit der Bilayeroberfläche in Abwesenheit von NaCl und

DCP zurückzuführen sein (53).

Aufschluß darüber, ob es sich bei den Zubereitungen um dispergierte Bilayerscheibchen oder um geschlossene Vesikel handelt, würden erst Gefrierbruchaufnahmen erbringen.

Das Vorliegen von Bilayerscheibchen würde durch die Abweichung von der Kugelform den gemessenen höheren Polydispersitätsindex im Vergleich zu den NaCl-haltigen Proben erklären. Bilayerscheiben würden allerdings einen hohen Cholatrestgehalt im Präparat zur Stabilisierung voraussetzen (37). Dieser Cholatrestgehalt müßte sich entgegen den vorliegenden Ergebnissen bei der Gelchromatographie unter Umformung der Bilayerscheiben in Vesikel größeren Durchmessers abtrennen (57).

2. Analytische Ultrazentrifugation

Über Analytische Ultrazentrifugation kann das Sedimentationsverhalten von Vesikeln als Folge einer angelegten Zentrifugalkraft verfolgt werden. Dazu wird entweder die Änderung des Brechungsindex entlang der Zentrifugenzone dargestellt (58) oder - wie in dieser Untersuchung - die UV-Absorption entlang der Zelle in Zeitabständen aufgezeichnet (59).

Da unterschiedlich große Vesikel unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit besitzen, kann an Hand der Aufzeichnungen die Homogenität der Vesikelpräparationen beurteilt werden. Darüber hinaus läßt sich aus der Sedimentationsgeschwindigkeit der Vesikel der Sedimentationskoeffizient s nach SVEDBERG berechnen (59). Diese Vesikel-Konstante ist bei gleichbleibendem Dispersionsmedium vom Vesikeldurchmesser und von der Packungsdichte des Vesikelwandmaterials abhängig.

Sind die Diffusionskonstante und das partielle spezifische Volumen (v^*) des Vesikelwandmaterials bekannt, so kann mit Hilfe des Sedimentationskoeffizienten das Partikelgewicht der Vesikel bestimmt werden (Formel siehe experimenteller Teil). v^* wird üblicherweise (25) der Literatur entnommen, da die Bestimmung sehr aufwendig ist.

Das Partikelgewicht verhält sich direkt proportional zu s und erhöht sich bei steigendem v^* .

Ergebnisse

Bei einer Auswahl an Detergentsdialyse-Liposomen wurde der Sedimentationskoeffizient über analytische Ultrazentrifugation bestimmt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tab. 3 wieder.

Im Gegensatz zur Auswertung über Schlierenbilder erlaubt die UV-spektroskopische Auswertung eine hohe Verdünnung der Probe. Wie die enge Streuung der Ergebnisse bei den arzneistofffreien SL-Vesikeln zeigt, konnte in diesem niedrigen Konzentrationsbereich keine Abhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten von der Lipidkonzentration festgestellt werden, so daß auf eine Extrapolation gegen die Konzentration 0 verzichtet wurde.

Rezeptur (LK = 30 mg/ml)	Sed.koeff. app. $\times 10^{-13}$	Rotations- geschw. (UPM)	LK ⁺⁾ bei UZ (mg/ml)	Durch- messer DLLS (nm)	Oberfl.*) $\times 10^3$ (nm ²)
SLH	84,3	20000	0,7	97	29,6
SLH/DCP 10 + 1,0	79,7	20000	0,7	79	19,6
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5	48,3	30000	0,7	69	15,0
SLH/DCP/Q10 10 + 1,0 + 0,5	46,7	30000	0,7	66	13,7
SL	14,8 $\pm 0,7$ n=9	40000	0,5 bis 6,0	69	15,0
EL	8,5	40000	1,8	72	16,3
EL/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5	2,9	48000	0,9	53	8,8

Tab. 3 Einfluß der Rezeptur auf den apparenten Sedimentationskoeffizienten von Detergensdialyse-Liposomen (bei 20°C)

+) Lecithinkonzentration bei der Ultrazentrifugation

*) Vesikeloberfläche berechnet aus dem Vesikeldurchmesser

Wird in der DCP-haltigen Rezeptur mit 5 Mol% Coenzym Q10 das SLH gegen EL ausgetauscht, so verringert sich der apparente Sedimentationskoeffizient ($s_{app.}$) um den Faktor 16. Demgegenüber wird durch den verringerten Durchmesser die Kugeloberfläche der Vesikel und damit der theoretische Platz für Phosphatidylcholinmoleküle im Bilayer nur etwa um das 1,6-fache vermindert. Ähnlich verhält es sich beim Vergleich der arznei-

stofffreien Vesikel aus SLH und SL. Innerhalb einer Lipidart hingegen können die Änderungen von s_{app} eher mit der Vesikelgrößenänderung korreliert werden.

Die Berechnung des Partikelgewichtes war nur bei arzneistofffreien EL-Vesikeln möglich, da für die anderen Rezepturen das partielle spezifische Volumen v^* nicht der Literatur entnommen werden konnte. Änderungen in der 3. Dezimalstelle von v^* bewirken bereits gravierende Änderungen im Partikelgewicht. Das für unsere EL-Vesikel errechnete Partikelgewicht nimmt deshalb je nach verwendetem v^* (45,60) Werte zwischen 23×10^6 und 43×10^6 an, entsprechend einer Aggregationszahl von 30000 bis 56000 Lecithinmolekülen.

Bei der qualitativen Auswertung des Sedimentationsverlaufs während der Zentrifugation zeigte sich bei allen Proben das Verhalten einer homogenen, schmal verteilten Größenpopulation, womit die Ergebnisse aus DLLS, Gelchromatographie und Elektronenmikroskopie bestätigt wurden.

In Abb. 17A ist eine Momentaufnahme des Extinktionsverlaufs entlang der Quarzzelle während der Zentrifugation bei SLH/DCP/Q10-Vesikeln dargestellt. Das Erscheinen eines einzigen symmetrischen Peaks bei der Aufzeichnung der Konzentrationsänderung entlang der Zelle (Abb. 17B), entsprechend der Änderung der Extinktion, wird als Beweis für die Homogenität der Probe gewertet (22,59).

Bei einer inhomogenen oder breit verteilten Probe müßten sich in der Aufzeichnung des Extinktionsverlaufs nach einiger Zeit mehrere Plateaustufen oder eine Abflachung der Steigung im Extinktionsanstieg zeigen (59). Beide Phänomene wurden nicht beobachtet.

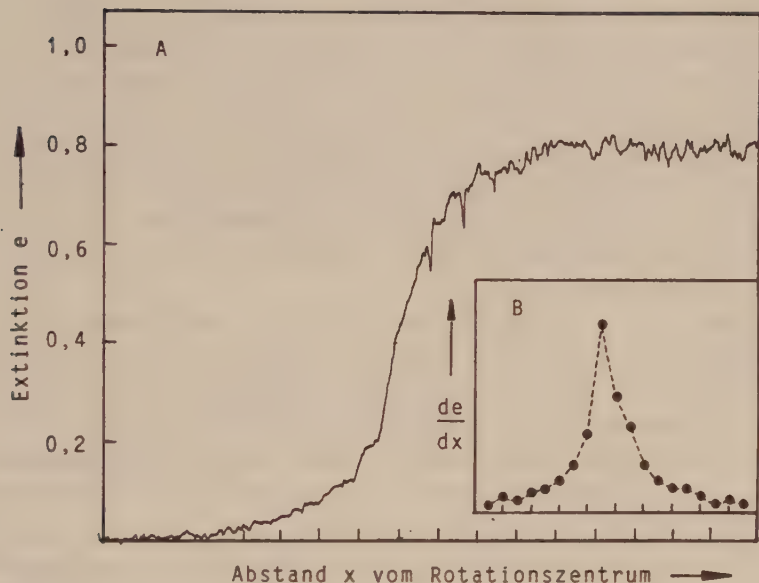


Abb. 17 A: Momentaufnahme des Extinktionsverlaufs ($\lambda = 285 \text{ nm}$) entlang der Zentrifugenzelle bei der Ultrazentrifugation von Detergendsialyse-Vesikeln (Rezeptur: SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5; LK: 30 mg/ml)
B: Darstellung der 1. Ableitung der Kurve aus Abb. 17A im Bereich des Extinktionsanstiegs

Diskussion

Tritt bei gleichbleibendem Teilchendurchmesser ein erhöhter Sedimentationskoeffizient s auf, so kann dies durch ein erhöhtes Partikelgewicht oder ein verringertes partielles spezifisches Volumen hervorgerufen werden (siehe Formel im experimentellen Teil). Beim Übergang vom ungesättigten zum gesättigten Phosphatidylcholin ändert sich das Molekulargewicht der Bilayerbausteine nur um 0,3 bis 0,8%. Folglich wird eine deutliche Erhöhung des Vesikelgewichtes bei gleichbleibendem Durchmesser nur durch zwei Vorgänge erreicht: Entweder liegt

eine dichtere Packung der Moleküle im Bilayer vor, wodurch gleichzeitig das partielle spezifische Volumen verringert wird, oder es handelt sich um multilamellare Vesikel anstatt monolamellarer.

Ein Vergleich der gemessenen s-Werte mit s-Werten aus der Literatur, bestimmt an nachweislich monolamellaren Vesikeln ähnlichen Durchmessers und ähnlicher Zusammensetzung (22,58), schließt das Vorliegen von multilamellaren Vesikeln als Grund für die s-Wert-Erhöhung aus.

Die Theorie einer dichteren Membranpackung der SLH-Vesikel im Vergleich zu den EL- und SL-Vesikeln läßt sich an Hand der unterschiedlichen Phasenübergangstemperatur der Lipide erklären: Wird die Phasenübergangstemperatur des Phospholipids wie im Falle des SLH unterschritten, so führt der erhöhte Ordnungsgrad zu einer lateralen Kontraktion des Bilayers unter gleichzeitiger Zunahme der Bilayerdicke (33).

SLH-Vesikel besitzen dadurch bei gleichem äußeren Durchmesser höhere Aggregationszahlen als SL-Vesikel. Als Folge befindet sich bei gleichbleibender Lecithinkonzentration in einer Dispersion aus SLH-Vesikeln eine geringere Teilchenanzahl (22). Eine verminderte Teilchenzahl hat jedoch bei der Inkorporation lipidlöslicher Stoffe nicht unbedingt die negative Konsequenz eines verringerten Einschlußvermögens, wie dies beim Einbau wasserlöslicher Arzneistoffe der Fall ist (22).

Die Übereinstimmung der Änderung des s-Wertes mit der Änderung der Vesikelgröße beim Vergleich arzneistofffreier und Coenzym Q10-haltiger SLH-Vesikel ist ein Hinweis darauf, daß der Arzneistoff, der das durchschnittliche Molekulargewicht der Membranbausteine nur um 0,6% erhöht, die Membranpackung nicht wesentlich verändert (61).

3. Bestimmung des Lipid- und Arzneistoffgehaltes der Vesikeldispersionen

Die Konzentrationsangaben der vorhergehenden Kapitel hatten sich jeweils auf die Einsatzmengen in den Rezepturen bezogen. Um zu überprüfen, ob während des Herstellungsprozesses ein Lipid- oder Arzneistoffverlust auftritt, sollte der Gehalt in den fertigen Zubereitungen bestimmt werden.

Lipidbestimmung

Der Lipidgehalt von Liposomen wird in der Literatur im wesentlichen über drei Methoden bestimmt:

- o Bestimmung des enthaltenen Phosphors als anorganisches Phosphat (62)
- o Szintillationszählung nach Zusatz radioaktiv markierter Lipide (25)
- o enzymatische Bestimmung unter Einsatz von Phospholipasen (20).

Da bei Anwesenheit von Coenzym Q10 eine Hemmung von Phospholipasen zu erwarten ist (63), wurde eine spektralphotometrische Lipidbestimmung über anorganisches Phosphat gewählt.

Coenzym Q10-Bestimmung

Wird der Coenzym Q10-Gehalt nicht über radioaktiv markierte Substanz (14) bestimmt, so liegt die Problematik der Bestimmung in der quantitativen Extraktion des lipophilen Stoffes aus biologischem Material (64). Bei den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Methoden wird die wäßrige lipidhaltige Phase des Plasma- oder Gewebeaufschlusses jeweils mehrfach mit geringen Mengen an Lösungsmittelgemischen ausgeschüttelt, die Extrakte eingedampft und in reinem Lösungsmittel aufgenommen (64-66). Während dieser Extraktionsvorgänge besteht die Gefahr von Coenzym Q10-Verlusten.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit für Liposomen ein einfacheres Extraktionsverfahren entwickelt, das bei gleichhoher durchschnittlicher Wiederfindungsrate (98,8%) eine niedrige Standardabweichung (0,4% n = 10) und einen wesentlichen Gewinn an Arbeitszeit im Vergleich mit anderen Extraktionsmethoden (64-66) erbringt:

Die Liposomenproben wurden auf Säulen mit hochgereinigtem Kieselgur (Extrelut) aufgebracht, das die wäßrige Phase zu binden vermag. Anschließend wurde mehrmals mit Chloroform eluiert, um Lipid und Arzneistoff zu extrahieren. Das definierte Volumen an Chloroformphase konnte direkt zur UV-spektroskopischen Messung gegen lipidhaltige Referenz herangezogen werden, da die Absorption der Lipide im Maximum des Arzneistoffs äußerst gering ist. Die gemeinsame Chloroform-Extraktion von Lipid und Coenzym Q10 verhindert das Auftreten von Trübungen in der Meßlösung. Bei der Extraktion von Vesikelproben mit Coenzym Q10-spezifischen Lösungsmittelgemischen (64-66) wurden von uns nach Aufnahme des Extraktes in reinem Lösungsmittel Trübungen beobachtet, bedingt durch die Verschleppung von Lipidspuren.

3.1 Detergensdialyse-Vesikel

Vesikel aus SLH

Die Herstellung der SLH-Vesikel muß bei mindestens 54°C erfolgen. Auf Grund des hohen Dampfdruckes, der bei dieser Temperatur im Mittelkompartiment des Dialysiergerätes herrscht, erfolgte eine Einengung der ursprünglich injizierten Mischmizelllösung von 7 ml auf ca. 5,5 ml. Dem verminderten Volumen entsprechend ergaben sich laut Tab. 4 folgende Lipid- und Arzneistoffgehalte:

Rezeptur	Lipid (SLH+DCP) % (n Chargen)	Coenzym Q10	
		% (n Chargen)	mg/ml
SLH/DCP/Q10 10 + 1,0 + 0,5 30 mg/ml SLH	127,7 ± 6,1 (4)	104,2 ± 5,4 (6)	1,77

Tab. 4 Gehalt an Lipid und Coenzym Q10 bei unverdünnten Detergensiälyse-Vesikeln aus SLH/DCP

Um die Lipidlagerkonzentration bei Vesikeln mit unterschiedlicher Herstellungstemperatur und Aufkonzentrierung gleich zu halten, wurde nach diesen Vorversuchen der Flüssigkeitsverlust durch Ergänzung von 1,5 ml Puffer ausgeglichen. Tab. 5 gibt die Ergebnisse wieder. Während demnach der Lipidgehalt in der erwarteten Größenordnung liegt, ist ein Verlust an ca. 10% Arzneistoff zu verzeichnen, unabhängig von der jeweiligen Arzneistoffkonzentration.

Rezeptur	Lipid (SLH+DCP) % (n Chargen)	Coenzym Q10	
		% (n Chargen)	mg/ml
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5 30 mg/ml SLH	97,5 ± 7,1 (4)	84,4 ± 3,3 (6)	1,43
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5 45 mg/ml SLH	93,0 ± 3,0 (2)	88,2 ± 0,1 (2)	2,25
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,25 30 mg/ml SLH		85,0 ± 0,8 (2)	0,72
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,75 30 mg/ml SLH		88,4 ± 0,7 (2)	2,25

Tab. 5 Gehalt an Lipid und Coenzym Q10 bei verdünnten Detergensiälyse-Vesikeln aus SLH/DCP

Vesikel aus SL

Bei einer Herstellungstemperatur von 22°C für die SL-Vesikel konnte dem Dialysiergerät erwartungsgemäß das injizierte Volumen quantitativ entnommen werden. Wie die Ergebnisse in Tab. 6 zeigen, liegt der Arzneistoffgehalt der Vesikel aus ungesättigtem Lipid bei gleicher Einsatzkonzentration um ca. 10% bis 15% unterhalb der Werte, die für die SLH-Vesikel bestimmt wurden.

Rezeptur	Lipid (SL) % (n Chargen)	Coenzym Q10	
		% (n Chargen)	mg/ml
SL/Q10 10 + 0,5 30 mg/ml SL	90,0 ± 7,9 (5)	75,0 ± 8,9 (6)	1,26
SL/Q10 10 + 0,5 45 mg/ml SL		74,9 ± 2,4 (2)	1,89

Tab. 6 Gehalt an Lipid und Coenzym Q10 bei Detergensdialyse-Vesikeln aus SL

3.2 Beschallte Vesikel nach der Aufarbeitung

Bei der Abtrennung des MLV-Anteils nach der Beschallung ist mit einem Lipid- und Arzneistoffverlust im SUV-Endprodukt zu rechnen. Aus Tab. 7 geht hervor, daß bei den beschallten Präparaten in der Tat ein Lipidverlust festzustellen ist, der mit dem jeweiligen Arzneistoffverlust in Einklang steht. Der Gesamtverlust liegt bei den cholesterolhaltigen Proben niedriger als bei den cholesterolfreien Zubereitungen, die nur noch die Hälfte der ursprünglich eingesetzten Konzentrationen enthalten.

Rezeptur	Lipid (SLH+DCP) % (n Chargen)	Coenzym Q10	
		% (n Chargen)	mg/ml
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,25 30 mg/ml SLH	52,5 ± 0,5 (2)	54,4 ± 0 (2)	0,46
SLH/Chol/Q10 5 + 5,0 + 0,25 30 mg/ml SLH +Chol	69,0 (1)	65,4 (1)	0,56

Tab. 7 Gehalt an Lipid und Coenzym Q10 bei beschallten Vesikeln nach der Zentrifugation

3.3 Chemische Stabilität und Adsorptionsverhalten von Coenzym Q10

Eine Reduktion des Chinonrings von Coenzym Q10 zum Hydrochinon würde eine geringere UV-Absorption zu Folge haben (67) und dadurch einen Arzneistoffverlust bei der Gehaltsbestimmung vortäuschen. Diese Reduktion, die im Organismus enzymatisch erfolgt und zu einer wirksameren Form des Arzneistoffs führt (68, 69), ist ohne Enzymkatalyse nur in Gegenwart starker Reduktionsmittel zu erwarten (67). Dennoch sollte abgeklärt werden, ob ein scheinbarer Arzneistoffverlust durch Reduktion während der Herstellung oder Lagerung auftritt:

Durch UV-spektroskopische Gehaltsbestimmung des Coenzym Q10 in Vesikeln aus SL und SLH vor und nach oxidativer Behandlung (70) konnte sichergestellt werden, daß keine Reduktion während der Herstellung erfolgt war.

Eine Reduktion während der Lagerung müßte sich in einer Verringerung der Extinktion im Maximum des Chinons äußern. Gehaltsbestimmungen nach einer Lagerdauer der Vesikel von 5 Monaten zeigten keinen signifikanten Gehaltsverlust im Vergleich zu den Werten nach der Herstellung.

Dem Herstellungsprozeß der Liposomen wurde in allen Fällen eine Membranfiltration mit Einwegfilterhaltern angeschlossen. Auch hier ergab die Prüfung, daß mit diesem Vorgang kein Gehaltsverlust verbunden ist.

3.4 Diskussion

Ein Arzneistoffverlust im Bereich von mindestens 10 bis 30% während der Detergensdialyse ist in der Literatur beim Einschluß lipophiler Prodrugs (Fettsäureester) mehrfach zu finden (16,22,24,71). Als Ursache wird ein Abdiffundieren von reinen Detergens/Arzneistoff-Mizellen zu Beginn der Dialyse in Betracht gezogen (71).

Für langkettige Kohlenwasserstoffe, wie es die isoprenoide Seitenkette des Coenzym Q10 darstellt, ist das Solubilisationsvermögen des Cholats beschränkt (34). Doch selbst ein Addukt aus einem Molekül Coenzym Q10 und 20 Molekülen Cholat könnte noch durch die von uns verwendete Cellulosemembran mit einer molekularen Ausschlußgrenze von 10000 hindurch diffundieren.

Möglicherweise würde die Verwendung einer Membran mit kleinerem Porendurchmesser den Arzneistoffverlust vermindern.

Vergleicht man die erzielten Coenzym Q10-Konzentrationen im Liposomenpräparat mit Werten aus der Literatur, so ist mit einer Konzentration von 2,25 mg/ml eine Erhöhung um den Faktor 7 erreicht worden gegenüber der einzigen bisher beschriebenen Konzentration in zur parenteralen Applikation bestimmten Liposomen (14).

Der Grund für diese Erhöhung dürfte in erster Linie im veränderten Herstellungsverfahren liegen, das keinen Aufreinigungsschritt erfordert. Wie die Konzentrationsbestimmungen bei unseren beschallten Vesikeln zeigen, bedeutet der Zentrifugationsschritt einen erheblichen Arzneistoffverlust. Wird wie in (14) eine Aufreinigung über Gelchromatographie vorgenommen, so muß eine starke Verdünnung des Produktes im Eluat in Kauf genommen werden, die eine Aufkonzentrierung durch Ultrafiltration notwendig macht. Selbst nach dieser Aufkonzentrierung besitzt das Präparat nur einen Coenzym Q10-Gehalt von 0,32 mg/ml. Die bisher von uns in homogenen Präparaten erreichte Coenzym Q10-Konzentration von 2,25 mg/ml liegt auch oberhalb der Konzentration, die in der Literatur für parenterale Coenzym Q10-Zubereitungen in Form von Emulsionen und Solubilisaten ge-

bräuchlich ist. Bei diesen Zubereitungen wird üblicherweise eine Coenzym Q10-Konzentration von 0,6 bis 1 mg/ml verarbeitet (10,69,72), in einem Fall bis zu 2,5 mg/ml (73).

Während sich in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt hatte, daß bei SLH-Vesikeln eine Steigerung der Arzneistoffkonzentration durch gleichzeitige Steigerung der Lipidkonzentration von 45 mg/ml auf 60 mg/ml inhomogene Produkte ergibt, steht die Überprüfung bei SL-Vesikeln noch aus.

Die Erhöhung der Lipidkonzentration von 30 mg/ml auf 45 mg/ml hatte bei arzneistofffreien SL-Vesikeln nicht wie bei den arzneistofffreien SLH-Vesikeln zu Inhomogenität geführt. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß bei SL die Vesikelbildung weniger stark von der Lipidkonzentration beeinflusst wird.

In einer Arbeit, die sich mit der Herstellung corticoidhaltiger Detergendsialyse-Vesikel aus SL beschäftigt, sind mit einer SL-Konzentration von 50 mg/ml homogene Vesikel gewonnen worden (74).

Unter der Voraussetzung einer Erhöhung der SL-Konzentration auf 60 mg/ml ist mit einer erreichbaren Coenzym Q10-Konzentration von 2,5 mg/ml im Endprodukt zu rechnen.

4. Prüfung von Vesikeldispersionen auf nicht inkorporiertes Coenzym Q10

Beim Einschluß hoher Coenzym Q10-Konzentrationen in Vesikel ist ein Anteil an nicht inkorporiertem Arzneistoff in der Dispersion nicht auszuschließen.

In Studien, bei denen ein Coenzym Q10-Einbau in Vesikel erfolgte, um die natürliche Funktion des Coenzym in der biologischen Membran zu erforschen, wurde eine Methode zur Bestimmung des nicht eingebauten Coenzym Q10 beschrieben (67,76). Die Prüfung beruht auf der selektiven Löslichkeit des Coenzym Q10 in Pentan. In Vesikel inkorporiertes Coenzym Q10 wird unter definierten Bedingungen nicht extrahiert, im Gegensatz zu ungebundenen Substanzaggregaten, die frei in der wäßrigen Dispersion vorliegen und quantitativ in die Pentanphase übergehen.

Die durch Pentan extrahierbare Menge Coenzym Q10 ist in Abb. 18 der Polydispersität verschiedener Detergentsdialyse-Vesikel mit steigender Coenzym Q10-Konzentration gegenübergestellt. Bei Vesikeln mit geringer Polydispersität kann von einem nahezu quantitativen Einbau des Arzneistoffs ausgegangen werden. Die Anwesenheit von nicht inkorporiertem Arzneistoff im Präparat ist mit dem Anstieg der Polydispersität korrelierbar.

Nicht abgebildet wurde das Ergebnis der Pentanextraktion einer SLH/DCP-Präparation mit 5 Mol% Coenzym Q10 bei einer erhöhten SLH-Konzentration von 45 mg/ml. Wie weiter oben gezeigt wurde, besitzt diese Zubereitung die gleiche Arzneistoffkonzentration von 2,25 mg/ml im Endprodukt wie die Präparation C in Abb. 18, jedoch mit einem Polydispersitätsindex unter 0,1. Erwartungsgemäß führt die höhere Lipidkonzentration zu einem Coenzym Q10-Einbau von 98% im Gegensatz zu 94% Einbau bei der Präparation C.

Auch bei allen Coenzym Q10-haltigen SL-Vesikeln geringer Polydispersität war ein eingebauter Anteil von mindestens 98% bestimmbar.

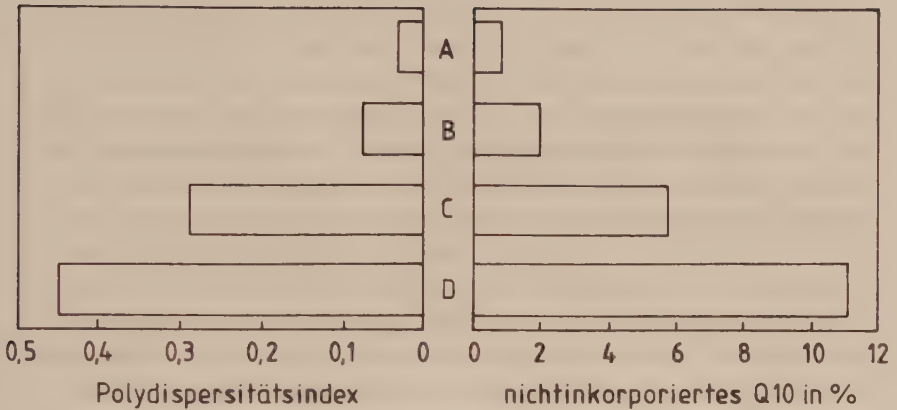


Abb. 18 Zusammenhang zwischen der Polydispersität und dem Vorliegen von nicht inkorporiertem Coenzym Q10 bei Detergendsdialyse-Vesikeln unterschiedlichen Coenzym Q10-Gehalts
(Die Konzentration an nicht inkorporiertem Coenzym Q10 wird bezogen auf den Gesamtgehalt)

Rezeptur: SLH/DCP/Q10; LK: 30 mg/ml

A: 10 + 0,5 + 0,25

C: 10 + 0,5 + 0,75

B: 10 + 0,5 + 0,5

D: 10 + 0,5 + 1,0

Bei beschallten Vesikeln konnte die Prüfung nur an cholesterolfreien Proben durchgeführt werden, da die Pentanollöslichkeit des Cholesterols zu hohe Coenzym Q10-Extraktionswerte hervorruft. Für beschallte SLH/DCP-Vesikel ergaben sich von Charge zu Charge schwankende Einbauraten zwischen 97,8 und 92,3% bei einem Einsatz von 2,5 bis 5 Mol% Coenzym Q10.

Diskussion

Da Coenzym Q10 in Wasser unlöslich ist, kann nicht inkorporiertes Coenzym Q10 in der Vesikeldispersion nur in aggregierter Form vorliegen (67). Solche Aggregate müßten sich bei den durchgeführten Prüfungen auf Vesikelhomogenität bemerkbar machen: Handelt es sich um große Aggregate, so sollte sich der Polydispersitätsindex der Proben bei DLLS-Messungen verschlechtern, während sich sehr kleine Aggregate bei der Aufzeichnung des Elutionsprofils der Gelchromatographie im Extinktionsmaximum des Arzneistoffs zeigen sollten. Ein Auftreten mehrerer Peaks im Elutionsdiagramm war jedoch jeweils auch mit einem hohen Polydispersitätsindex verbunden. Die Ergebnisse der Pentanextraktion der Vesikelproben aus dem Detergentsdialyse-Verfahren zeigen, daß sich bereits der Austritt geringer Arzneistoffmengen in einer Verschlechterung der Polydispersität äußert. Neben dem Auftreten von Aggregaten als unmittelbare Ursache für die breitere Teilchengrößenverteilung ist allerdings auch ein fusionsfördernder Effekt von nicht inkorporiertem Coenzym Q10 (75) auf die Vesikel während der Dialyse in Betracht zu ziehen.

Für beschallte Vesikel aus Eilecithin (20 mg/ml, Badbeschallung) ist in der Literatur bei einem Coenzym Q10-Zusatz von 5 Mol% ein Einbau von 92% bestimmt worden (76), in Übereinstimmung mit den von uns gefundenen Werten. Bei multilamellaren Vesikeln gleicher Zusammensetzung kommt die Studie hingegen nur auf 58% Einbau.

In einer anderen Untersuchung führt die Beschallung mit eintauchendem Schallrüssel bei Vesikeln ähnlicher Zusammensetzung nur zu 45% inkorporiertem Coenzym Q10-Anteil (67), woraus die Abhängigkeit des eingebauten Anteils von den Herstellungsbedingungen ersichtlich wird.

5. Untersuchung mit Registrierender Differential-Kalorimetrie (DSC)

Mit Hilfe des DSC-Verfahrens (Differential Scanning Calorimetry) kann der Einfluß des Einbaus lipophiler Arzneistoffe auf die Phasenübergangstemperatur von Vesikelbilayern untersucht werden. Aus diesem Einfluß des Arzneistoffs können Rückschlüsse bezüglich der räumlichen Anordnung des Arzneistoffs im Membranbilayer gezogen werden (21,77).

Die empfindliche Methode zeigt den Unterschied in der Wärmemenge an, der bei der Vesikelprobe benötigt wird, um sie in einem bestimmten Zeitintervall auf die gleiche Temperatur aufzuheizen wie eine vesikelfreie Vergleichsprobe (53).

Im Bereich der Phasenübergangstemperatur nimmt die Bilayerstruktur während des Aufheizens Energie auf, um vom geordneten lamellaren Gelzustand in den beweglicheren flüssigkristallinen Zustand überzugehen. Der endotherme Prozeß äußert sich bei der Aufzeichnung des Thermogramms in einem für die jeweilige Membran charakteristischen Profil.

In unserer Untersuchung wurde der Einfluß von 5 Mol% Coenzym Q10 auf den Phasenübergang von Vesikeln aus SLH und SLH/DCP untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 19A bis D zusammengestellt, wobei die Temperatur im jeweiligen Maximum des Heizleistungsunterschieds ($T_{\max}$) - bezogen auf die ansteigende Basislinie - die Phasenübergangstemperatur darstellt. Da es sich bei SLH um eine Mischung verschiedener Phosphatidylcholine handelt, erhält man im Vergleich zu den Thermogrammen synthetischer Phosphatidylcholine (21,77) relativ breite Phasenübergangsbereiche, deren Maxima jedoch bei den arzneistofffreien Präparationen eindeutig bestimmbar sind. Die gefundene Phasenübergangstemperatur von 53,1°C des SLH stimmt gut mit dem Literaturwert von 53,5°C (20) überein. Ein Vergleich der beiden arzneistofffreien Rezepturen zeigt, daß sich der Einbau des DCP weder auf die Lage des Maximums noch auf das Profil des Phasenübergangs merklich auswirkt. Der Einbau von 5 Mol% Coenzym Q10 bewirkt hingegen unter leichter Herabsetzung der Temperatur des Maximums eine deutliche Änderung des Profils des Phasenübergangs.

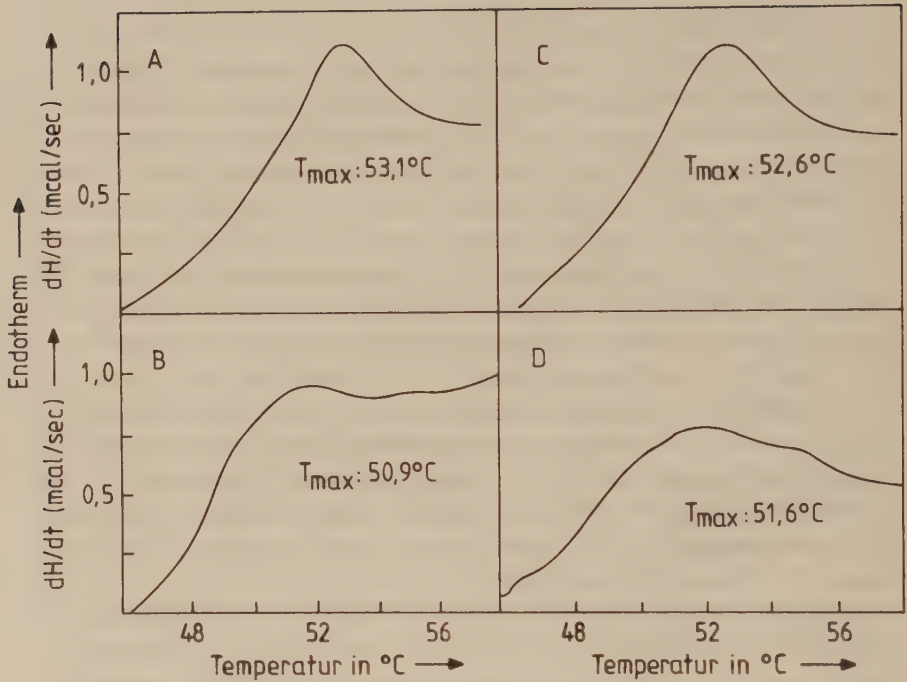


Abb. 19 Einfluß von inkorporiertem Coenzym Q10 auf den Phasenübergang von Detergendsialyse-Vesikeln aus SLH (LK: 30 mg/ml; DSC-Heizrate: 10°C/min)

- A: SLH
B: SLH/Q10 10 + 0,5
C: SLH/DCP 10 + 0,5
D: SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5

Wie das nicht in die Darstellung einbezogene Thermogramm einer SLH/DCP-Zubereitung mit 2,5 Mol% Coenzym Q10 zeigt, reicht auch eine geringere Arzneistoffkonzentration aus, um die Änderung des Profils einzuleiten.

Diskussion

Wird ein Molekül in genügend hoher Konzentration parallel zu den Fettsäureresten der Phosphatidylcholinmoleküle in den Membranbilayer eingelagert, so ist mit einer Veränderung im Profil des Phasenübergangs der Struktur zu rechnen (77).

Während sich die Einlagerung geeigneter Kohlenwasserstoffketten (78) wie im Falle des Dicetylphosphates kaum auswirkt, ist von der Einlagerung des Coenzym Q10-Moleküls eine gravierendere Störung der Ordnung im Bilayer zu erwarten. Zahlreiche Studien zur Lokalisierung dieses Moleküls, dessen Länge in ausgestreckter Form die Dicke des biologischen Membranbilayers übersteigt, kommen zu unterschiedlichsten Ergebnissen und lassen sich meist nicht mit der Funktion des Coenzym in der mitochondrialen Membran in Einklang bringen (Übersicht in 80): In diesen Studien, die an MLV und beschallten SUV aus synthetischen Lipiden durchgeführt wurden, konnte kein Einfluß des Coenzym Q10 auf das Thermogramm des Bilayers festgestellt werden, selbst bei Coenzym Q10-Konzentrationen, die im Vergleich mit unseren Untersuchungen um das 10-fache erhöht waren (77, 79). Das Ausbleiben einer Störung des Phasenübergangs läßt sich unter der Voraussetzung einer erfolgten Coenzym Q10-Inkorporation nur erklären, wenn sich die Coenzym Q10-Moleküle in den Bilayerkern "sandwich"-artig zwischen die beiden Lipidmonolayer einlagern, teilweise in aggregierter Form (79).

Diese Coenzym Q10-Lokalisierung schirmt jedoch den aktiven Chinonbereich des Moleküls von den Membranoberflächen ab und widerspricht dadurch der Funktion des Moleküls in der mitochondrialen Atmungskette (80).

Der in unseren Untersuchungen festgestellte Einfluß des Coenzym Q10 auf das Bilayer-Thermogramm deckt sich mit der Vorstellung einer Einlagerung des Chinonrings in den hydrophilen Bereich der Membranoberfläche unter teilweise lateralem Einbau des langen Isoprenoidrestes (schematische Darstellung in Abb. 20) (8,80).

Die Abweichung unserer Ergebnisse von Studien mit anderen Modellmembranen könnten auf das veränderte Herstellungsverfahren zurückzuführen sein:

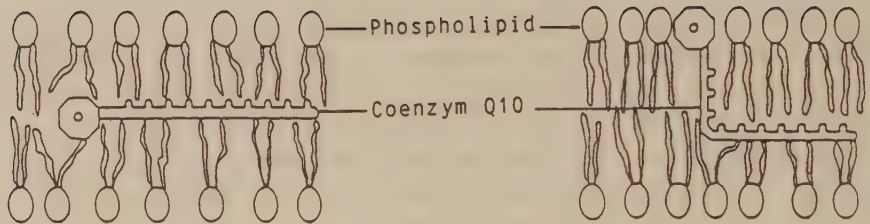


Abb. 20 Schematische Darstellung der diskutierten Möglichkeiten zur Lokalisierung des Coenzym Q10-Moleküls in der Phospholipiddoppelschicht (8)

Coenzym Q10-haltige MLV enthalten nachweislich einen hohen Anteil an aggregiertem, teilweise nicht inkorporiertem Coenzym Q10, der durch Beschallung dispergiert werden muß (76). Demgegenüber wird bei der Detergendsialyse die Membran aus kleinsten Untereinheiten aufgebaut (81), so daß eine veränderte Lokalisierung und Dispersität angenommen werden kann.

Ein zusätzlicher möglicher Grund für die veränderte Coenzym Q10-Interaktion in unseren Untersuchungen könnte in der längeren Kohlenstoffkette der SLH-Phosphatidylcholine (überwiegend Stearoylreste) gesehen werden im Vergleich mit dem üblicherweise verwendeten Dipalmitoylphosphatidylcholin (77,79). Diese Überlegung stützt sich auf den Befund in der Literatur, daß hohe Coenzym Q10-Konzentrationen (24 Mol%) nur das Thermogramm von MLV-Bilayern aus Distearoylphosphatidylcholin verändern. Das Thermogramm von Bilayern aus Dipalmitoylphosphatidylcholin bleibt unverändert (82).

III. Untersuchungen zur Lagerstabilität der Vesikelpräparationen

1. Lagerstabilität der Vesikel im Hinblick auf die oxidative Veränderung ungesättigter Lipide

Bei Liposomen aus Lipiden mit einem Anteil an ungesättigten Fettsäuren besteht die Gefahr von Autoxidationsprozessen. Das Ausmaß, in dem diese Reaktionen ablaufen, ist in erster Linie abhängig von Sauerstoffgehalt, Inkubationstemperatur, Lichteinwirkung und Anwesenheit katalytisch wirkender Schwermetallionen (32,83).

Obwohl die Reaktionsprodukte toxisch sind (84) und eine Vesikelfusion bewirken können (85), ist in den wenigsten Fällen eine Überprüfung der oxidativen Veränderungen in Vesikelpräparationen während der Herstellung und Lagerung zu finden (45,86).

Die Untersuchung dieser Veränderungen kann über UV-Spektroskopie erfolgen, da sich im Anfangsstadium des Oxidationsprozesses konjugierte Dien-Hydroperoxide bilden, die bei ca. 233 nm ein Extinktionsmaximum besitzen (87). Üblich ist die Bildung des sogenannten Oxidationsindex nach KLEIN (87), für den der Extinktionswert bei 233 nm auf den oxidationsunabhängigen Extinktionswert bei 215 nm bezogen wird. Dadurch erhält man eine von der Lipidkonzentration unabhängige Größe.

Die Bildung des Index konnte allerdings nur bei arzneistofffreien Präparationen erfolgen, da Coenzym Q10 im betroffenen Wellenlängenbereich selbst absorbiert.

Zu Beginn unserer Untersuchungen an oxidationsempfindlichen Detergensdialyse-Vesikeln aus SL wurden folgende präventive Maßnahmen während der Herstellung und Lagerung ergriffen:

- o Zusatz von 0,2% (G/G) Tocopherol zum SL
- o Stickstoffbegasung von Dialyse- und Dispergierungspuffer
- o Abfüllung der Vesikeldispersionen in stickstoffbegaste Ampullen

- o Beschränkung der Herstellungstemperatur auf 22°C und der Lagertemperatur auf 2°C
- o Verhinderung von Lichteinwirkung auf die Präparationen

Der Oxidationsindex des Lipides vor der Verarbeitung betrug ca. 0,4 in Übereinstimmung mit Befunden aus der Literatur (86). Dieser Ausgangswert blieb bei einer Lipid-Lagertemperatur von -30°C über den Untersuchungszeitraum von drei Jahren unverändert. Bei den entsprechenden Vesikelpräparationen hingegen konnten Veränderungen in Abhängigkeit vom gewählten Dispersionsmedium festgestellt werden:

Die obere Kurve in Abb. 21 zeigt, daß die eingangs beschriebenen Maßnahmen allein nicht in der Lage waren, bei arzneistofffreien Detergendsdialyse-Vesikeln ein Ansteigen des Oxidationsindex während der Herstellung und Lagerung zu verhindern. Ebenso wies eine Zunahme der Extinktion bei 233 nm auf die Bildung von Oxidationsprodukten bei Coenzym Q10-haltigen Vesikeln hin, wie aus Abb. 22A hervorgeht.

Aus Abb. 21 und Abb. 22B ist jedoch weiterhin ersichtlich, daß eine Eindämmung dieser Oxidationsprozesse durchaus erreicht werden konnte, wenn Herstellung und Lagerung der Vesikel in Gegenwart von Di-Natrium-EDTA erfolgte.

Die geringfügige Abnahme der Extinktion der stabilisierten Coenzym Q10-haltigen Dispersion während der Dialyse (Abb. 22B) könnte auf den abdialysierenden Coenzym Q10-Anteil zurückzuführen sein.

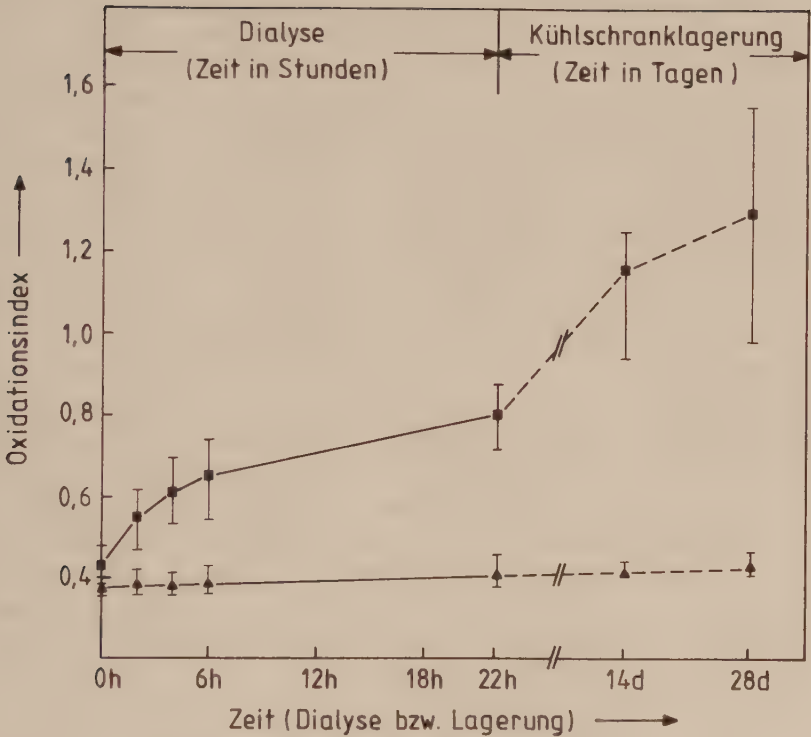


Abb. 21 Veränderung des Oxidationsindexes nach KLEIN (87) bei arzneistofffreien Detergentsdialyse-Vesikeln aus SL (LK: 30 mg/ml) während der Herstellung und Lagerung (n = 5)

- ohne Zusatz von Di-Natrium-EDTA
- ▲- 1 mM Di-Natrium-EDTA im Puffermedium

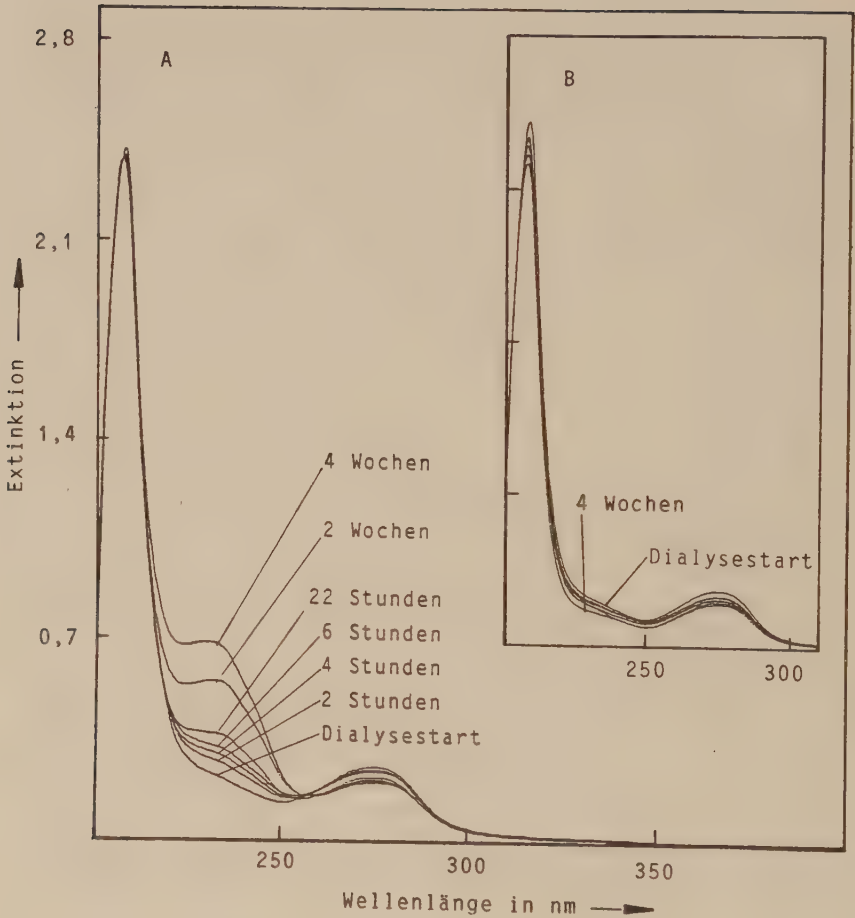


Abb. 22 Veränderung des UV-Spektrums von Coenzym Q10-haltigen Detergentsdialyse-Vesikeln aus SL während der Herstellung und Lagerung (aufgenommen nach Lyse in Ethanol)
Rezeptur: SL/Q10 10+0,5; LK: 30 mg/ml

A: ohne Zusatz von Di-Natrium-EDTA

B: 1 mM Di-Natrium-EDTA im Puffermedium

Diskussion

Die Durchführung sämtlicher Herstellungsschritte des Detergentsdialyse-Verfahrens unter einer abgeschlossenen Inertgasatmosphäre erscheint nur schlecht realisierbar. Ist jedoch die Gefahr einer geringen Sauerstoffexposition gegeben, so kann der Zusatz von Tocopherol (oder anderer Antioxidantien) in Gegenwart katalytisch wirkender Schwermetallionen lediglich ein verzögertes Einsetzen der Oxidationsprozesse bewirken (32). Auch ein in der Literatur beschriebener antioxidativer Effekt von Coenzym Q10 auf Modellmembranen (88) reicht offensichtlich nicht aus, um in Kombination mit Tocopherol die Membranoxidation zu verhindern.

Der positive Effekt des Zusatzes von Di-Natrium-EDTA auf die oxidative Stabilität unserer Präparationen läßt auf die Anwesenheit katalytisch wirkender Schwermetallionen schließen. Die Kontamination mit Metallionen erscheint während des Herstellungsprozesses der Vesikel an mehreren Stellen möglich: Die Pufferherstellung erfolgte mit einfach destilliertem Wasser aus einer Ganzglasapparatur. Bei dieser Wasserbereitung besteht die Gefahr der Einschleppung flüchtiger Kupferhydride (89).

Weiterhin enthält die verwendete p.a.-Qualität der im Puffer gelösten Salze Schwermetallspuren im ppm-Bereich.

Die Hauptgefahr dürfte allerdings in der Korrosion von Metallteilen des Lipoprep-Gerätes liegen, die mit den Puffer-Medien während der Dialyse in Kontakt kamen und deren Veränderung trotz regelmäßigem Auswechseln mit bloßem Auge erkennbar war.

Eine Verhinderung der katalytischen Wirkung von Metallionen auf die Oxidation von Lipiden in Membranstrukturen ist in biochemischen Studien durch Chelatisierung der Ionen mit EDTA mehrmals beobachtet worden (z.B. 90).

Obwohl auch die Stabilität von Parenteralia häufig über einen Zusatz von EDTA verbessert wird (89), ist ein Zusatz von EDTA zu injizierbaren Liposomendispersionen bisher nicht üblich. Die Konzentration von 1 mM EDTA in unseren Untersuchungen beträgt das 3-fache der für Parenteralia gebräuchlichen Konzen-

tration (89), so daß zu überprüfen wäre, ob auch eine geringere Konzentration zur Stabilisierung der Vesikeldispersionen ausreicht.

Neben der Chelatisierung von Schwermetallionen vermag EDTA auch Calciumionen in der Dispersion zu binden, woraus ein weiterer stabilisierender Einfluß des EDTA-Zusatzes abgeleitet werden kann (27):

Auf Vesikel mit negativ geladenen Membranbestandteilen können Calciumionen einen fusionsfördernden Effekt ausüben (91). Deshalb wurde der EDTA-Zusatz in unseren Untersuchungen auch bei Vesikelpräparationen aus hydriertem Lipid vorgenommen.

2. Lagerstabilität der Vesikeldispersionen im Hinblick auf Sedimentation

2.1 Visuelle Beurteilung der Vesikeldispersionen

Bilden sich in Vesikelpräparationen größere Aggregate, so ist mit visuell sichtbaren Sedimentationserscheinungen zu rechnen (22). Da die Aggregation eine Vorstufe der Vesikelfusion darstellen kann (92), erlaubt eine einfache organoleptische Prüfung der Präparate unter Umständen bereits Aussagen über die physikalische Stabilität der Präparationen.

Über einen Lagerzeitraum von 3 Monaten bei 2°C wurden ausgewählte Vesikelpräparationen durch Betrachtung im Streulicht auf redispersierbare Sedimentationen hin untersucht.

Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen wurde auf die Überprüfung des Einflusses von inkorporierten Ladungsträgern und Cholesterol gelegt.

In den vorhergehenden Kapiteln ist als Ladungsträger ausschließlich die preisgünstige Modellsubstanz DCP verwendet worden. Mit DCP-haltigen Vesikeln wurden in der Literatur bei intracerebraler Applikation Nebenwirkungen beobachtet (93). Deshalb sollten hier in die Beurteilung auch Präparationen mit den verträglicheren geladenen Lipiden Phosphatidylserin (PS) und Dimyristoylphosphatidsäure (DMPA) einbezogen werden.

Detergentsdialyse-Vesikel

In Tab. 8 und Tab. 9 sind die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Rezeptur für Zubereitungen aus gesättigtem und ungesättigtem Lipid aufgelistet.

Bei einem ersten Vergleich der beiden Tabellen wird sichtbar, daß bei Zubereitungen aus hydriertem Lipid die Einflüsse der Rezeptur auf die Sedimentationserscheinungen stärker ausgeprägt sind als bei Zubereitungen aus ungesättigten Lipiden. Die Präparationen aus ungesättigtem Lipid neigen insgesamt betrachtet weniger zur Sedimentation.

Sowohl bei arzneistofffreien als auch bei Coenzym Q10-haltigen SLH-Rezepturen ohne Ladungsträger sind deutliche Sedimen-

Nr.	Rezeptur		visuelle Prüfung nach		
	Zusammensetzung	molare Anteile	1 Mo.	2 Mo.	3 Mo.
1	SL		(+)	(+)	(+)
2	EL		(+)	(+)	(+)
3	SL ⁺)		(+)	(+)	(+)
4	SL [*])		-	-	(+)
5	EL [*])		-	-	-
6	SL/Chol	10 + 3,0	-	-	-
7	SL/Q10	10 + 0,25	(+)	(+)	(+)
8	SL/Q10	10 + 0,5	(+)	(+)	(+)
9	SL/Q10	10 + 0,75	(+)	+	++
10	SL/Q10	10 + 1,0	(+)	+	++
11	SL/Q10 ⁺)	10 + 0,5	(+)	(+)	(+)
12	SL/Q10 [*])	10 + 0,5	-	(+)	(+)
13	EL/Q10 [*])	10 + 0,5	-	(+)	(+)
14	SL/Chol/Q10	10 + 3,0 + 0,5	(+)	(+)	(+)
15	SL/DCP /Q10	10 + 0,5 + 0,5	(+)	(+)	(+)
16	EL/DCP /Q10	10 + 0,5 + 0,5	(+)	(+)	(+)
17	SL/PS /Q10	10 + 0,5 + 0,5	-	(+)	(+)
18	SL/PS /Q10	10 + 1,0 + 0,5	-	-	(+)

Tab. 8 Einfluß der Rezeptur auf die Sedimentation von Detergendsialyse-Vesikeln aus ungesättigten Lipiden während der Lagerung (n = 2)

- +) LK = 45 mg/ml statt 30 mg/ml
- *) Isotonisierung mit Sorbit statt NaCl
- beim Schütteln keine Schlierenbildung
- (+) beim Schütteln kaum sichtbare Schlierenbildung
- + beim Schütteln deutlich sichtbare Schlierenbildung
- ++ vor dem Schütteln geringer Bodensatz sichtbar
- +++ vor dem Schütteln voluminöser Bodensatz sichtbar

Nr.	Rezeptur		visuelle Prüfung nach		
	Zusammensetzung	molare Anteile	1 Mo.	2 Mo.	3 Mo.
19	SLH		(+)	+	++
20	SLH/Chol	10+1,0	+++	+++	+++
21	SLH/DCP	10+0,5	-	(+)	(+)
22	SLH/DCP	10+1,0	-	-	-
23	SLH/DCP ^{+))}	10+0,5	+++	+++	+++
24	SLH/Q10	10+0,25	+	+	+
25	SLH/Q10	10+0,5	+	++	++
26	SLH/Chol/Q10	10+1,0+0,25	++	++	++
27	SLH/Chol/Q10	10+1,0+0,5	+	+	++
28	SLH/DCP /Q10	10+0,5+0,25	(+)	(+)	(+)
29	SLH/DCP /Q10	10+0,5+0,5	-	(+)	(+)
30	SLH/DCP /Q10	10+1,0+0,25	-	-	-
31	SLH/DCP /Q10	10+1,0+0,5	-	-	-
32	SLH/DCP /Q10 ^{+))}	10+0,5+0,5	(+)	(+)	(+)
33	SLH/Chol/DCP/Q10	10+1,0+0,5+0,5	++	++	++
34	SLH/DMPA/Q10	10+0,5+0,25	(+)	(+)	(+)
35	SLH/DMPA/Q10	10+0,5+0,5	-	(+)	(+)

Tab. 9 Einfluß der Rezeptur auf die Sedimentation von Detergentsdialyse-Vesikeln aus SLH während der Lagerung (n = 2)

- +) LK = 45 mg/ml statt 30 mg/ml
- beim Schütteln keine Schlierenbildung
- (+) beim Schütteln kaum sichtbare Schlierenbildung
- + beim Schütteln deutlich sichtbare Schlierenbildung
- ++ vor dem Schütteln geringer Bodensatz sichtbar
- +++ vor dem Schütteln voluminöser Bodensatz sichtbar

tationserscheinungen zu erkennen. Sofern es sich dabei um cholesterolfreie Präparationen handelt, lassen sich diese Sedimente durch einen genügend hohen Zusatz an Ladungsträger völlig beseitigen.

Ein Vergleich von Rezeptur Nr. 25 mit Nr. 29 und 35 zeigt, daß DMPA in ähnlicher Weise wie DCP die Sedimentation unterdrückt. Obwohl DMPA im Gegensatz zu DCP zwei negative Ladungen pro Molekül trägt, reicht die halbe DMPA-Konzentration offensichtlich nicht zu einer gleichwertigen Stabilisierung im Vergleich mit DCP aus.

Die stärkste Sedimentation wurde bei den arzneistofffreien Rezepturen Nr. 20 und 23 beobachtet, deren Qualität sich auch in den vorhergehenden Kapiteln als unbefriedigend herausgestellt hatte.

Bei der Coenzym Q10-haltigen Rezeptur Nr. 32 wirkt sich die Erhöhung der Vesikelkonzentration im Vergleich zu Nr. 29 kaum auf die Sedimentationstendenz aus.

Abweichend von den SLH-Rezepturen erwies sich ein Cholesteroleinbau in SL-Vesikel als positiv im Hinblick auf Schlierenbildung (Nr. 6). Der Effekt beschränkte sich allerdings auf die arzneistofffreie Rezeptur.

Für arzneistofffreie SL- und EL-Präparate stellte sich auch der Austausch von NaCl gegen Sorbit als günstig heraus.

Die einzige Möglichkeit, bei Coenzym Q10-haltigen SL-Zubereitungen die ohnehin verschwindend geringe Schlierenbildung zu vermindern, besteht im Zusatz von 10 Mol% PS. Wie bereits früher erläutert, war ein entsprechend hoher DCP-Zusatz hier nicht möglich. Geringere DCP-Zusätze lieferten auch bei nicht in die Tabelle einbezogenen arzneistofffreien SL-Präparationen keine Verbesserung.

Zwischen den Zubereitungen aus EL und SL sind praktisch keine Unterschiede organoleptisch zu erkennen.

Die Erhöhung der Coenzym Q10-Konzentration über 5 Mol%, die sich bei SL-Vesikeln nicht gravierend auf die Ausgangspolydispersität ausgewirkt hatte, äußert sich bei der visuellen Prüfung in einer Bodensatzbildung während der Lagerung.

Nr.	Rezeptur		Me- thode	visuelle Prüfung nach		
	Zusammensetzung	molare Anteile		1 Mo.	2 Mo.	3 Mo.
36	SLH		B	-	-	-
37	SLH		H	-	-	-
38	SLH/Chol	5 + 5,0	B	+	+	+
39	SLH/Chol	5 + 5,0	H	++	++	++
40	SLH/DCP	10 + 0,5	B	-	-	-
41	SLH/DCP	10 + 0,5	H	-	-	-
42	SLH/Q10	10 + 0,25	B	-	(+)	(+)
43	SLH/Q10	10 + 0,25	H	(+)	(+)	(+)
44	SLH/Q10	10 + 0,5	B	(+)	(+)	(+)
45	SLH/Q10	10 + 0,5	H	(+)	(+)	(+)
46	SLH/Chol/Q10	5 + 5,0 + 0,25	B	(+)	(+)	(+)
47	SLH/Chol/Q10	5 + 5,0 + 0,25	H	++	++	++
48	SLH/Chol/Q10	5 + 5,0 + 0,5	B	(+)	(+)	(+)
49	SLH/Chol/Q10	5 + 5,0 + 0,5	H	+++	+++	+++
50	SLH/DCP /Q10	10 + 0,5 + 0,25	B	-	-	-
51	SLH/DCP /Q10	10 + 0,5 + 0,25	H	-	-	-
52	SLH/DCP /Q10	10 + 0,5 + 0,5	B	-	-	-
53	SLH/DCP /Q10	10 + 0,5 + 0,5	H	-	-	-

Tab. 10 Einfluß der Rezeptur und der Herstellungsmethode
auf die Sedimentation von SUV aus SLH (LK = 30 mg/ml)

B = Beschallungsmethode

H = Hochdruckdüsenhomogenisierung

- beim Schütteln keine Schlierenbildung

(+) beim Schütteln kaum sichtbare Schlierenbildung

+ beim Schütteln deutlich sichtbare Schlierenbildung

++ vor dem Schütteln geringer Bodensatz sichtbar

+++ vor dem Schütteln voluminöser Bodensatz sichtbar

Vesikel nach der Beschallungsmethode und der Hochdruckdüsen-homogenisierung

Wie Tab. 10 zeigt, wurden neben Detergendsialyse-Vesikeln auch die SLH-Rezepturen aus den beiden anderen Herstellungsverfahren in die Untersuchung einbezogen.

Bis auf die hochdruckhomogenisierten Präparationen mit Cholesterol und Coenzym Q10 (Nr. 47 und 49) weisen die Präparationen der Tab. 10 im Vergleich mit den Detergendsialyse-Vesikeln aus Tab. 8 ein vermindertes Sedimentationsverhalten auf.

2.2 Bestimmung des Zetapotentials

Die Aggregationstendenz von dispergierten Vesikeln kann durch die Erhöhung ihres Zetapotentials vermindert werden (92). Die Größe des Zetapotentials hängt einerseits von der Art und der Konzentration der inkorporierten Ladungsträger, andererseits aber auch von der Ionenart und Ionenstärke der im Dispersionsmedium gelösten Salze ab. Eine hohe Ionenstärke führt dabei zu einem geringeren Zetapotential (20,27,92).

Die Höhe des Zetapotentials läßt sich bei geeigneten Vesikeldispersionen über Laser-Doppler-Anemometrie bestimmen. Gemessen wird dabei die elektrophoretische Mobilität der dispergierten Teilchen. Bei genügend hohem Teilchendurchmesser und genügend hoher Konzentration an geladenen Teilchen läßt sich diese Mobilität von der reinen Diffusionsbewegung unterscheiden (94). Unter Verdünnung mit dem jeweiligen Dispersionspuffer der Präparation gelang eine reproduzierbare Bestimmung des Zetapotentials nur bei Vesikeln auf SLH-Basis.

Rezeptur		Zetapotential	
Zusammensetzung	molare Anteile	(mV)	s*)
SLH		+ 0,2	
SLH/DCP	10 + 0,5	- 8,9	± 0,2
SLH/DCP	10 + 1,0	-16,2	± 0,3
SLH/DMPA	10 + 0,5	- 8,3	± 0,7
SLH/DCP /Q10	10 + 0,5 + 0,5	-10,9	± 0,1
SLH/DCP /Q10	10 + 1,0 + 0,5	-19,5	± 1,1
SLH/DMPA/Q10	10 + 0,5 + 0,5	-13,5	± 0,3

Tab. 11 Einfluß des Ladungsträgerzusatzes auf das Zetapotential von arzneistofffreien und Coenzym Q10-haltigen Detergendsialyse-Vesikeln
(Dispersionsmedium: 10 mM Phosphat, 1 mM EDTA, isotonisiert mit NaCl, pH 7,4)

*) Standardabweichung aus 3 Messungen

Die Ergebnisse der Bestimmungen gehen aus Tab. 11 hervor. Bei Ladungsträgereinbau konnte trotz der Gegenwart einer isotonischen Konzentration an NaCl ein negatives Zetapotential aufgebaut werden. Eine Verdopplung der Ladungsträgerdichte im Vesikel hat dabei auch eine Verdopplung des Zetapotentialwertes zu Folge. Zwischen den arzneistofffreien und den entsprechenden Coenzym Q10-haltigen Präparationen sind keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Ebenso macht sich ein Austausch von DCP gegen DMPA kaum bemerkbar.

2.3 Diskussion

Eine verstärkte Aggregationstendenz von Vesikeln unterhalb ihrer Phasenübergangstemperatur T_c ist von mehreren Autoren festgestellt worden (92,95).

Die Untersuchungen mit Analytischer Ultrazentrifugation hatten gezeigt, daß die Vesikel auf SLH-Basis auf Grund ihrer dichteren Membranpackung einen bis zu 16-fach erhöhten Sedimentationskoeffizienten aufweisen im Vergleich zu den entsprechenden SL-Vesikeln. Ein Aggregat aus SLH-Vesikeln mit derart hohem Sedimentationskoeffizienten läßt eine schnellere Sedimentation während der Lagerung erwarten als ein Aggregat aus der gleichen Anzahl an SL-Vesikeln. Diesen Überlegungen zu Folge muß die Beobachtung eines stärkeren Bodensatzes bei SLH-Vesikeln nicht unbedingt nur auf verstärkte Vesikelinteraktionen zurückzuführen sein.

Die weniger dichte Packung der SL-Membran im Vergleich zur SLH-Membran bei der Lager- und Prüftemperatur dürfte auch in einer geringeren Ladungsdichte in der Membran resultieren bei Einbau gleicher Ladungsträgerkonzentration. Dies könnte als Grund dafür angesehen werden, daß der Ladungsträgereinbau in die SL-Membran kaum eine Sedimentationsverminderung während der Lagerung zur Folge hatte.

Werden die Zetapotentialbestimmungen mit der visuellen Beurteilung verglichen, so kann postuliert werden, daß zur vollständigen Unterdrückung der Sedimentation von hochkonzentrierten Präparationen aus SLH unterhalb der T_c ein Zetapotential von ca. -15 bis -20 mV erforderlich ist.

Das DMPA-Molekül sollte im pH-Wert des Prüfpuffers eigentlich mehr als eine negative Ladung tragen (3). Trotzdem wurde kein proportional höheres Potential gemessen. Dementsprechend erfolgte keine vollständige Sedimentationsunterdrückung.

Die hier beobachtete Lagerstabilität der sorbitisotonisierten Zubereitungen steht im Gegensatz zu Befunden in der Literatur (20), wo Detergendsialyse-Vesikel aus SL/Cholesterol in Sor-

bittlösung nach 7 Tagen Lagerdauer Ausflockungen zeigten. Die Ausflockungen wurden dort auf die Sorbitisotonisierung zurückgeführt.

Bei der Beurteilung der verminderten Sedimentation von beschallten Präparaten im Vergleich mit den Detergendsialyse-Vesikeln muß die geringere Lipidkonzentration durch die Aufarbeitung der beschallten Präparate einbezogen werden: Befunde in der Literatur zeigen, daß die Aggregationstendenz von Vesikeln bei Erhöhung der Lipidkonzentration ansteigt (95).

Die höheren Vesikeldurchmesser der beschallten und hochdruck-homogenisierten Präparate hatten insgesamt eine stärkere Opaleszenz im Vergleich mit den Detergendsialyse-Präparaten zur Folge. Dadurch wurde möglicherweise die Beobachtung geringer Schlierenbildungen erschwert.

3. Lagerstabilität der Vesikeldispersionen im Hinblick auf Vesikeldurchmesser und Homogenität

Über einen Lagerzeitraum von 12 Wochen bei 2°C wurden von verschiedenen Rezepturen jeweils 2 Chargen über Dynamisches Laser-Light-Scattering auf Veränderungen des mittleren Teilchendurchmessers und des Polydispersitätsindex untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Vermessung einiger länger eingelagerter Chargen. Dabei wurden auch Einlagerungen bei 20°C in die Untersuchung einbezogen.

Unsere Einlagerungen erfolgten alle in unverdünntem Zustand, wodurch eine bis zu 10-fache Lipidkonzentration zum Einsatz kam im Vergleich mit anderen Lagerstudien an SUV aus gesättigten und ungesättigten Lipiden (20,96). Aus diesem Grund besaß auch die Beobachtung der Coenzym Q10-freien Proben besondere Bedeutung.

3.1 Detergendsialyse-Vesikel aus hydriertem Sojalecithin

Wie bereits bei der visuellen Beurteilung der Dispersionen zu Tage getreten war, machte sich der Einfluß der Rezeptur auf die Lagerstabilität besonders bei den Rezepturen auf SLH-Basis bemerkbar.

Arzneistofffreie Vesikel

Bei den homogenen arzneistofffreien SLH-Vesikeln blieb die Polydispersität und der mittlere Durchmesser unabhängig vom DCP-Gehalt über 12 Wochen praktisch unverändert, wie aus Tab. 12 hervorgeht. Auch die Untersuchung der ca. 10 Monate gelagerten Chargen (Nr. 244, 247, 264) ließ keine Verschlechterung der Vesikelqualität erkennen.

Die visuell feststellbaren Sedimentationserscheinungen der ladungsträgerfreien SLH-Vesikel ohne Arzneistoff sind folglich auf reversible Interaktionen zurückzuführen.

Rezeptur	Chr.	DM 1	PD 1	DM 84	PD 84	x	DM x	PD x
SLH	360	95,3	0,01	98,8	0,02			
	371	97,6	0,02	100,9	0,04			
SLH/DCP 10 + 0,5	362	87,2	0,02	89,1	0,04			
	377	88,5	0,01	90,9	0,04			
	264					279d	91,8	0,02
	247					304d	94,2	0,02
	244					307d	93,1	0,02
SLH/DCP 10 + 1,0	361	80,6	0,02	80,3	0,02			
	376	78,2	0,03	79,0	0,06			

Tab. 12 Mittlerer Durchmesser und Polydispersität von arzneistofffreien Detergensdialyse-Vesikeln aus SLH in Abhängigkeit von der Lagerdauer

Erklärung der Abkürzungen:

Chr. : Chargennummer

DM 1 : mittlerer Durchmesser nach 1 Tag (nm)

PD 1 : Polydispersitätsindex nach 1 Tag

DM 84 : mittlerer Durchmesser nach 84 Tagen (nm)

PD 84 : Polydispersitätsindex nach 84 Tagen

x : Lagerdauer von Chargen, die länger als 84 Tage gelagert wurden

DM x : mittlerer Durchmesser nach x Tagen (nm)

PD x : Polydispersitätsindex nach x Tagen

Coenzym Q10-haltige Vesikel

In Abb. 23 und 24 sind zum einen der mittlere Durchmesser und zum anderen die Polydispersität von DCP-freien und DCP-haltigen Zubereitungen unterschiedlichen Coenzym Q10-Gehalts während der Lagerung aufgezeichnet. Während bei der Polydispersitätsbestimmung in Abb. 24 teilweise eine größere Schwankungsbreite beobachtet wurde, betrug der Unterschied der mittleren Durchmesser der beiden jeweils untersuchten Chargen maximal 4 nm, bei den DCP-haltigen Rezepturen sogar nur 1,4 nm.

Ein Einbau von 2,5 Mol% Coenzym Q10 bewirkt keine Verschlechterung der Lagerstabilität im Vergleich mit den arzneistofffreien Proben aus Tab. 12.

Wird die Coenzym Q10-Konzentration bei den DCP-freien Vesikeln

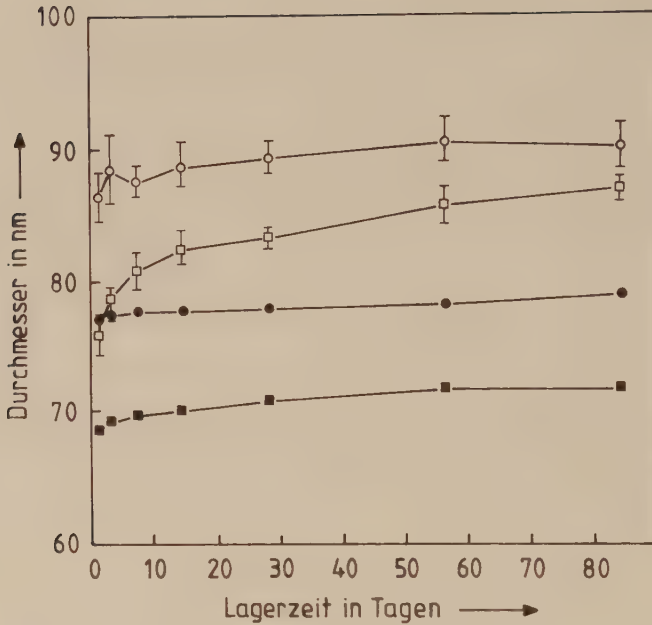


Abb. 23 Lagerstabilität des mittleren Durchmessers von Detergendsialyse-Vesikeln aus SLH in Abhängigkeit von DCP-Zusatz und Coenzym Q10-Konzentration (n = 2; LK: 30 mg/ml)

- SLH/Q10 10 + 0,25
- SLH/Q10 10 + 0,5
- SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,25
- SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5

auf 5 Mol% erhöht, so ist ein Anwachsen des mittleren Durchmessers um 10 nm innerhalb von 12 Wochen festzustellen, einhergehend mit einem Anstieg des Polydispersitätsindex. Der DCP-Zusatz vermag diese Veränderungen zu vermindern. Die Bedeutung des unterschiedlichen Anstieges des Polydispersitätsindex während der Lagerung in Abhängigkeit vom DCP-Zusatz veranschaulicht die Darstellung der Größenverteilungen über die DLLS-Software in Abb. 25 für jeweils eine Charge. Bei der dargestellten Berechnung der Verteilung der Streulichtintensität (51) gegen den Durchmesser macht sich das

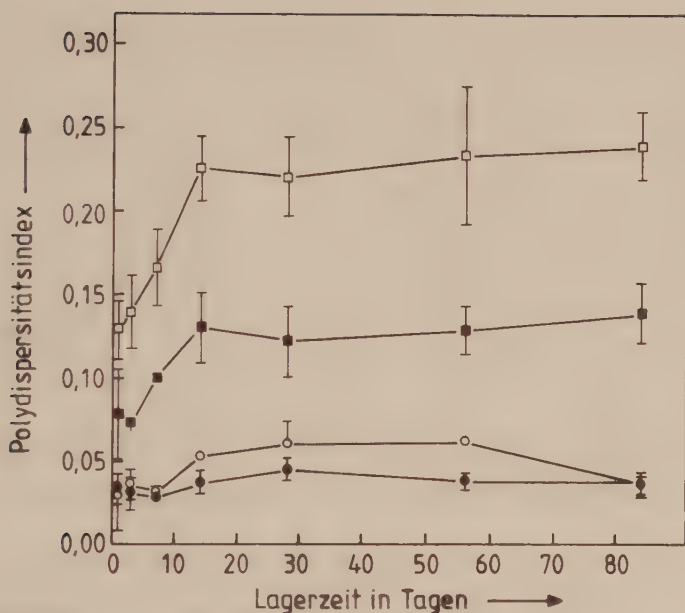


Abb. 24 Veränderung des Polydispersitätsindex von Detergensiälyse-Vesikeln aus SLH während der Lagerung in Abhängigkeit von DCP-Zusatz und Coenzym Q10-Konzentration (n = 2; LK: 30 mg/ml)

- o- SLH/Q10 10 + 0,25
- SLH/Q10 10 + 0,5
- SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,25
- SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5

Auftreten von größeren Partikeln besonders empfindlich bemerkbar, da Partikel größeren Durchmessers in geringerer Anzahl die gleiche Streulichtintensität hervorrufen wie eine größere Anzahl kleinerer Teilchen.

Während der Lagerung über 12 Wochen bildete sich in der Charge ohne DCP ein Anteil an Vesikeln oder Aggregaten mit einem Durchmesser von 200 bis 360 nm. Bei den DCP-haltigen Vesikeln hingegen war praktisch keine Veränderung der Größenverteilung während der Lagerung zu beobachten.

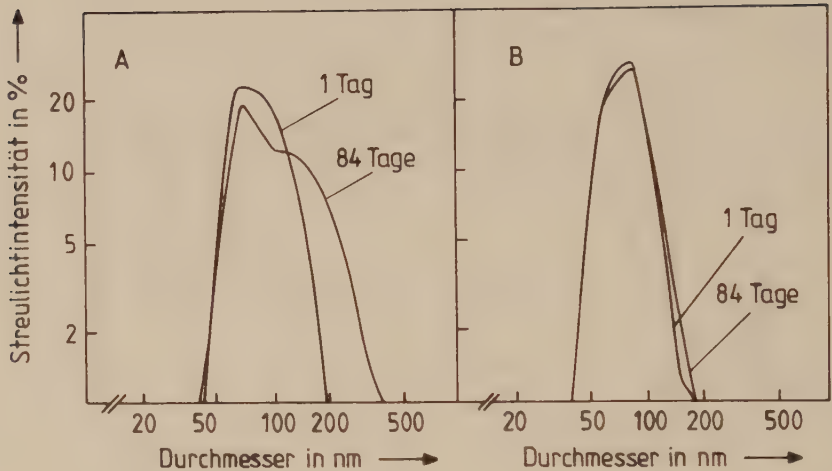


Abb. 25 Einfluß des DCP-Zusatzes auf die Verbreiterung der Größenverteilung von Coenzym Q10-haltigen Detergendsdialyse-Vesikeln aus SLH während der Lagerung (LK = 30 mg/ml)

A: SLH/Q10 10 + 0,5

Durchmesser nach 1 Tag :	77,1 nm
Durchmesser nach 84 Tagen:	87,6 nm
Polydispersitätsindex nach 1 Tag :	0,146
Polydispersitätsindex nach 84 Tagen:	0,260

B: SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5

Durchmesser nach 1 Tag :	68,8 nm
Durchmesser nach 84 Tagen:	70,9 nm
Polydispersitätsindex nach 1 Tag :	0,051
Polydispersitätsindex nach 84 Tagen:	0,121

Einen Vergleich der 12-Wochen-Lagerung mit längerer Lagerung bei 2°C und 20°C liefert Tab. 13, in die auch die Ergebnisse für erhöhte Lipidkonzentration aufgenommen sind.

Wird die Coenzym Q10-Konzentration auf 2,5 Mol% beschränkt, so kann die Präparation sowohl bei 2°C als auch bei 20°C für mindestens 7 Monate gelagert werden bei nahezu unveränderter Vesikelqualität. Eine Erhöhung der Coenzym Q10-Konzentration auf 5 Mol% bringt bei einer Lagerung von 6 bis 10 Monaten eine

Rezeptur	Chr.	DM 1	PD 1	DM 84	PD 84	x	DM x	PD x
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,25 (LK = 30 mg/ml)	368	77,2	0,02	78,6	0,03			
	378	76,4	0,04	78,7	0,04			
	297					219d	82,0	0,03
	296					220d	82,0	0,02
	293					225d	81,6	0,07
	287*)					229d	78,2	0,04
	286*)					230d	78,9	0,04
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5 (LK = 30 mg/ml)	379	68,8	0,05	70,9	0,12			
	394	68,3	0,10	72,3	0,16			
	245					304d	76,6	0,16
	243					306d	75,1	0,10
	242					307d	73,6	0,15
	317*)					192d	79,5	0,16
	299*)					218d	77,5	0,16
SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5 (LK = 45 mg/ml)	369	71,2	0,08	74,7	0,10			
	380	70,3	0,10	73,7	0,10			
	321					189d	78,3	0,15
	315					195d	78,0	0,11
	311					199d	80,3	0,15
	321*)					189d	79,5	0,16
	289*)					229d	79,0	0,11

Tab. 13 Mittlerer Durchmesser und Polydispersität von Detergentsdialyse-Vesikeln aus SLH/DCP während der Lagerung in Abhängigkeit von der Lipid- und der Coenzym Q10-Konzentration

*) Lagertemperatur 20° statt 2°C

Erklärung der Abkürzungen:

Chr. : Chargennummer

DM 1 : mittlerer Durchmesser nach 1 Tag (nm)

PD 1 : Polydispersitätsindex nach 1 Tag

DM 84: mittlerer Durchmesser nach 84 Tagen (nm)

PD 84: Polydispersitätsindex nach 84 Tagen

x : Lagerdauer von Chargen, die länger als 84 Tage gelagert wurden

DM x : mittlerer Durchmesser nach x Tagen (nm)

PD x : Polydispersitätsindex nach x Tagen

Vergrößerung des mittleren Durchmessers bis zu 10% mit sich, ohne daß eine Verschlechterung der Polydispersität festgestellt werden kann.

Eine Erhöhung der Lecithinkonzentration auf 45 mg/ml hat dabei offensichtlich keinen nachteiligen Einfluß.

Im Zusammenhang mit der visuellen Beurteilung der Präparationen während der Lagerung hatte sich herausgestellt, daß erst eine Erhöhung der DCP-Konzentration auf 10 Mol% ausreicht, um Sedimentationserscheinungen vollständig zu unterbinden. Die DLLS-Untersuchung solcher Zubereitungen sowie von Präparationen, bei denen DCP durch DMPA ersetzt worden war, wird in Tab. 14 dargelegt.

Rezeptur	Chr.	DM 1	PD 1	DM 84	PD 84
SLH/DMPA/Q10 10 + 0,5 + 0,25	282	75,8	0,06	77,1	0,05
	384	73,7	0,08	76,3	0,07
SLH/DMPA/Q10 10 + 0,5 + 0,5	381	66,7	0,10	74,1	0,18
	383	66,6	0,12	74,4	0,14
SLH/DCP/Q10 10 + 1,0 + 0,25	366	66,5	0,05	69,5	0,09
	372	70,1	0,04	72,1	0,06
SLH/DCP/Q10 10 + 1,0 + 0,5	363	65,8	0,18	73,7	0,27
	374	66,2	0,18	74,1	0,27

Tab. 14 Lagerstabilität des mittleren Durchmessers und der Polydispersität von Coenzym Q10-haltigen Detergendsialyse-Vesikeln aus SLH mit verschiedenen Ladungsträgerzusätzen

Erklärung der Abkürzungen:

Chr. : Chargennummer

DM 1 : mittlerer Durchmesser nach 1 Tag (nm)

PD 1 : Polydispersitätsindex nach 1 Tag

DM 84 : mittlerer Durchmesser nach 84 Tagen (nm)

PD 84 : Polydispersitätsindex nach 84 Tagen

Eine Erhöhung der DCP-Konzentration äußert sich bei einem Einbau von 5 Mol% Coenzym Q10 in einer Verschlechterung der Polydispersität während der Lagerung auf Werte, die der DCP-freien Zubereitung (siehe Abb. 24) gleichkommen. Bei Einbau der halben Arzneistoffkonzentration ist die Zubereitung mit 10 Mol% DCP lagerstabil.

Der Austausch von DCP gegen DMPA bringt bei 5 Mol% Coenzym Q10 eine geringfügig verschlechterte Lagerstabilität der Vesikel im Vergleich mit den Werten aus Tab. 13 mit sich.

3.2 Detergentsdialyse-Vesikel aus ungesättigten Lipiden

Einfluß der Lipid- und Arzneistoffkonzentration

Abb. 26 enthält die Lagerkurven für SL-Vesikel mit unterschiedlicher Lipid- und Coenzym Q10-Konzentration. Über den Zeitraum von 12 Wochen waren nur bei den beiden Zubereitungen mit über 5 Mol% Coenzym Q10 wesentliche Änderungen feststellbar, die sich auch in einem Ansteigen des Polydispersitätsindex (nicht abgebildet) bemerkbar machten.

Neben den obigen Chargen konnten arzneistofffreie und Coenzym Q10-haltige Vesikelpuben mit einem Alter bis zu 2 Jahren vermessen werden. Die dazugehörigen Werte sind der Tab. 15 zu entnehmen. Während die arzneistofffreien Proben sich über 2 Jahre als völlig lagerstabil erwiesen, war bei den Proben mit 5 Mol% Q10 eine Zunahme des mittleren Durchmessers um insgesamt ca. 8 nm und eine Erhöhung des Polydispersitätsindex zu beobachten.

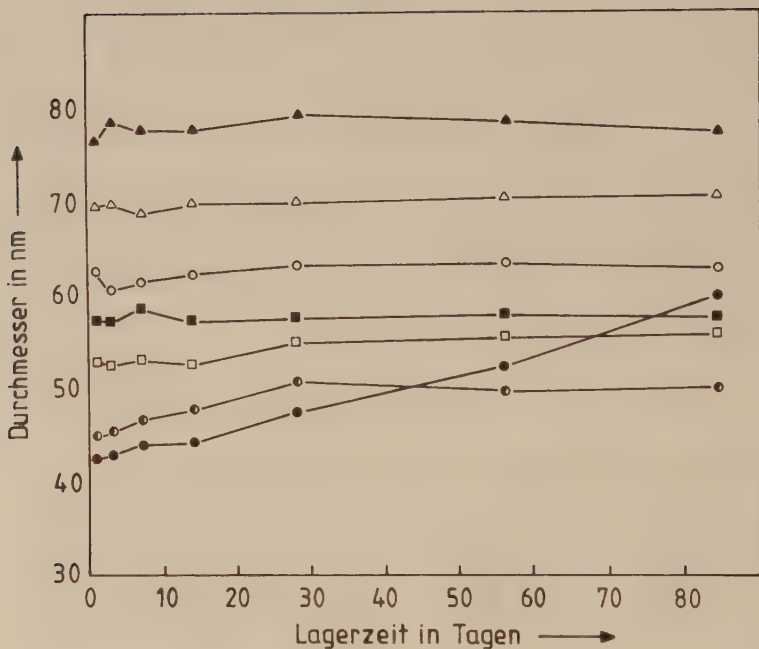


Abb. 26 Lagerstabilität des mittleren Durchmessers von Detergentsdialyse-Vesikeln aus SL in Abhängigkeit von Lipid- und Coenzym Q10-Konzentration (n = 2)

-▲-	SL	LK: 45 mg/ml
-△-	SL	LK: 30 mg/ml
-○-	SL/Q10 10 + 0,25	LK: 30 mg/ml
-■-	SL/Q10 10 + 0,5	LK: 45 mg/ml
-□-	SL/Q10 10 + 0,5	LK: 30 mg/ml
-●-	SL/Q10 10 + 0,75	LK: 30 mg/ml
-●-	SL/Q10 10 + 1,0	LK: 30 mg/ml

Rezeptur	Chr.	DM 1	PD 1	DM 84	PD 84	x	DM x	PD x
SL	349	68,7	0,01	71,0	0,02			
	411	69,6	0,01	70,1	0,01			
	164					507d	72,5	0,05
	125					681d	72,1	0,01
	107					718d	73,4	0,01
SL/Q10	350	52,1	0,04	56,1	0,04			
	352	52,9	0,03	55,6	0,07			
	163					508d	60,1	0,12
	122					688d	59,3	0,17
	104					733d	61,9	0,16

Tab. 15 Lagerstabilität des mittleren Durchmessers und der Polydispersität von Detergendsialyse-Vesikeln aus SL über einen Zeitraum von bis zu 2 Jahren in Abhängigkeit vom Coenzym Q10-Zusatz

Erklärung der Abkürzungen:

Chr. : Chargennummer

DM 1 : mittlerer Durchmesser nach 1 Tag (nm)

PD 1 : Polydispersitätsindex nach 1 Tag

DM 84: mittlerer Durchmesser nach 84 Tagen (nm)

PD 84: Polydispersitätsindex nach 84 Tagen

x : Lagerdauer von Chargen, die länger als 84 Tage gelagert wurden

DM x : mittlerer Durchmesser nach x Tagen (nm)

PD x : Polydispersitätsindex nach x Tagen

Einfluß des Isotonisierungszusatzes

Wenige Chargen mit Sorbit als Isotonisierungszusatz anstelle des ansonsten verwendeten NaCl standen zur Überprüfung der Lagerstabilität zu Verfügung. Die geringe Anzahl an Meßwerten in Tab. 16 läßt Aussagen nur unter Vorbehalt zu. Die Proben mit Eilecithin erscheinen etwas stabiler zu sein im Vergleich mit den Zubereitungen aus Sojalecithin. Eine wesentliche Änderung der Vesikeleigenschaften während der Lagerung tritt nicht auf. Auch nach 6 Monaten Lagerung weisen die Rezepturen einen mittleren Durchmesser auf, der maximal die Hälfte desjenigen bemißt, der mit NaCl-Isotonisierung erreicht wird.

Rezeptur	Chr.	DM 1	PD 1	DM 84	PD 84	x	DM x	PD x
SL Isot.m.Sorb.	356	17,4	0,19	20,4	0,33			
	332					180d	24,7	0,34
EL Isot.m.Sorb.	358	16,3	0,20	19,0	0,23			
	334					178d	20,5	0,27
SL/Q10 10 + 0,5 Isot.m.Sorb.	357	15,2	0,21	20,9	0,30			
	333					179d	24,5	0,25
EL/Q10 10 + 0,5 Isot.m.Sorb.	359	15,0	0,25	18,1	0,24			
	335					177d	17,9	0,32

Tab. 16 Lagerstabilität von Detergensdialyse-Vesikeln aus ungesättigten Lipiden in Anwesenheit von Sorbit als Isotonisierungszusatz anstelle von NaCl (LK: 30 mg/ml)

Erklärung der Abkürzungen:

Chr. : Chargennummer

DM 1 : mittlerer Durchmesser nach 1 Tag (nm)

PD 1 : Polydispersitätsindex nach 1 Tag

DM 84: mittlerer Durchmesser nach 84 Tagen (nm)

PD 84: Polydispersitätsindex nach 84 Tagen

x : Lagerdauer von Chargen, die länger als 84 Tage gelagert wurden

DM x : mittlerer Durchmesser nach x Tagen (nm)

PD x : Polydispersitätsindex nach x Tagen

Einbau von Ladungsträgern und Cholesterol

Wie aus den Lagerkurven in Abb. 27 hervorgeht, sind keine wesentlichen Änderungen bei Coenzym Q10-haltigen SL-Vesikeln über den Zeitraum von 12 Wochen zu beobachten, unabhängig vom Zusatz an Phosphatidylserin (PS) oder Cholesterol. Weiter oben hatte sich gezeigt (Tab. 15), daß nach einer 2jährigen Lagerung von PS-freien SL-Vesikeln mit inkorporiertem Coenzym Q10 Veränderungen auftreten. Möglicherweise würde eine größere Chargenzahl bei Lagerung über einen längeren Zeitraum einen stabilisierenden Effekt von Phosphatidylserin herausstellen,

den in Abb. 27 das leichte Ansteigen des PS-freien Vesikeldurchmessers (30 mg/ml) im Gegensatz zum PS-haltigen nahelegt.

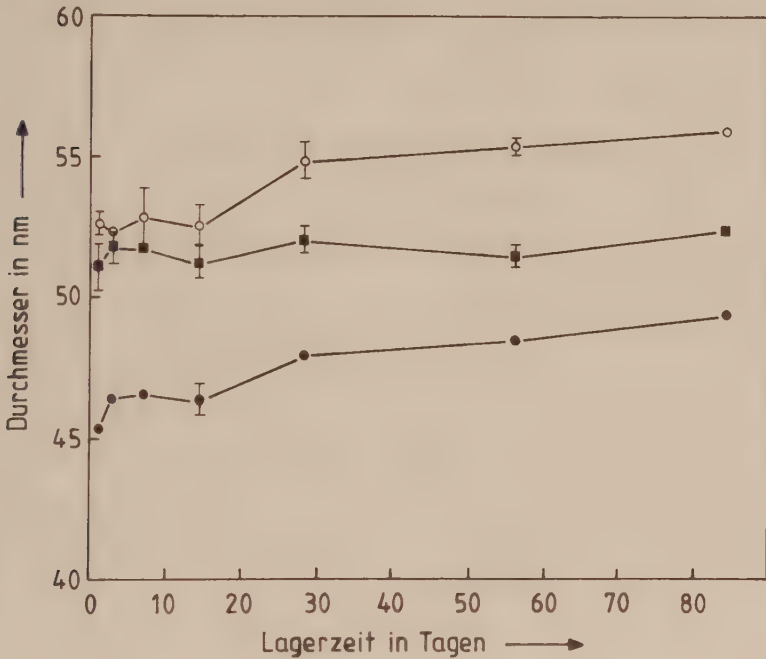


Abb. 27 Lagerstabilität des mittleren Durchmessers von Coenzym Q10-haltigen Detergensi-dialyse-Vesikeln aus SL in Abhängigkeit von Ladungsträger- und Cholesterol-Zusatz (n = 2; LK: 30 mg/ml)

- | | | |
|-----|-------------|----------------|
| -○- | SL/Q10 | 10 + 0,5 |
| -■- | SL/PS/Q10 | 10 + 1,0 + 0,5 |
| -●- | SL/Chol/Q10 | 10 + 3,0 + 0,5 |

3.3 Einfluß des Herstellungsverfahrens der Vesikel

Die in den vorhergehenden Kapiteln vorgestellten Vesikel aus den Verfahren der Beschallung und der Hochdruckdüsenhomogenisierung werden im folgenden hinsichtlich ihrer Lagerstabilität mit den entsprechenden Detergensdialyse-Vesikeln verglichen.

Vesikel ohne Ladungsträger- und Cholesterolzusatz

Abb. 28 stellt die Lagerkurven der drei Herstellungsverfahren für SLH-Vesikel unterschiedlicher Coenzym Q10-Konzentration einander gegenüber.

In den ersten 2 bis 4 Wochen fanden bei den beschallten und den düsenhomogenisierten Vesikeln Vergrößerungen des mittleren Durchmessers um 20 bis 60 nm statt. Bei den düsenhomogenisierten Proben führte der Coenzym Q10-Zusatz zu einer Verschlechterung der Lagerstabilität im Gegensatz zum Verhalten der beschallten Coenzym Q10-haltigen Zubereitungen. Der hohe Polydispersitätsindex der beschallten und düsenhomogenisierten Proben tendierte während der Lagerung zur Verkleinerung (nicht abgebildet).

DCP-haltige Vesikel

Abb. 29 zeigt die Lagerkurven der DCP-haltigen SLH-Vesikel aus den unterschiedlichen Herstellungsverfahren.

Auf beide Coenzym Q10-haltige Zubereitungen nach der Hochdruckdüsenhomogenisierung wirkte sich der DCP-Zusatz positiv aus, wie ein Vergleich mit Abb. 28 herausstellt. Dies traf auch auf die beschallten Vesikel mit 5 Mol% Coenzym Q10 zu.

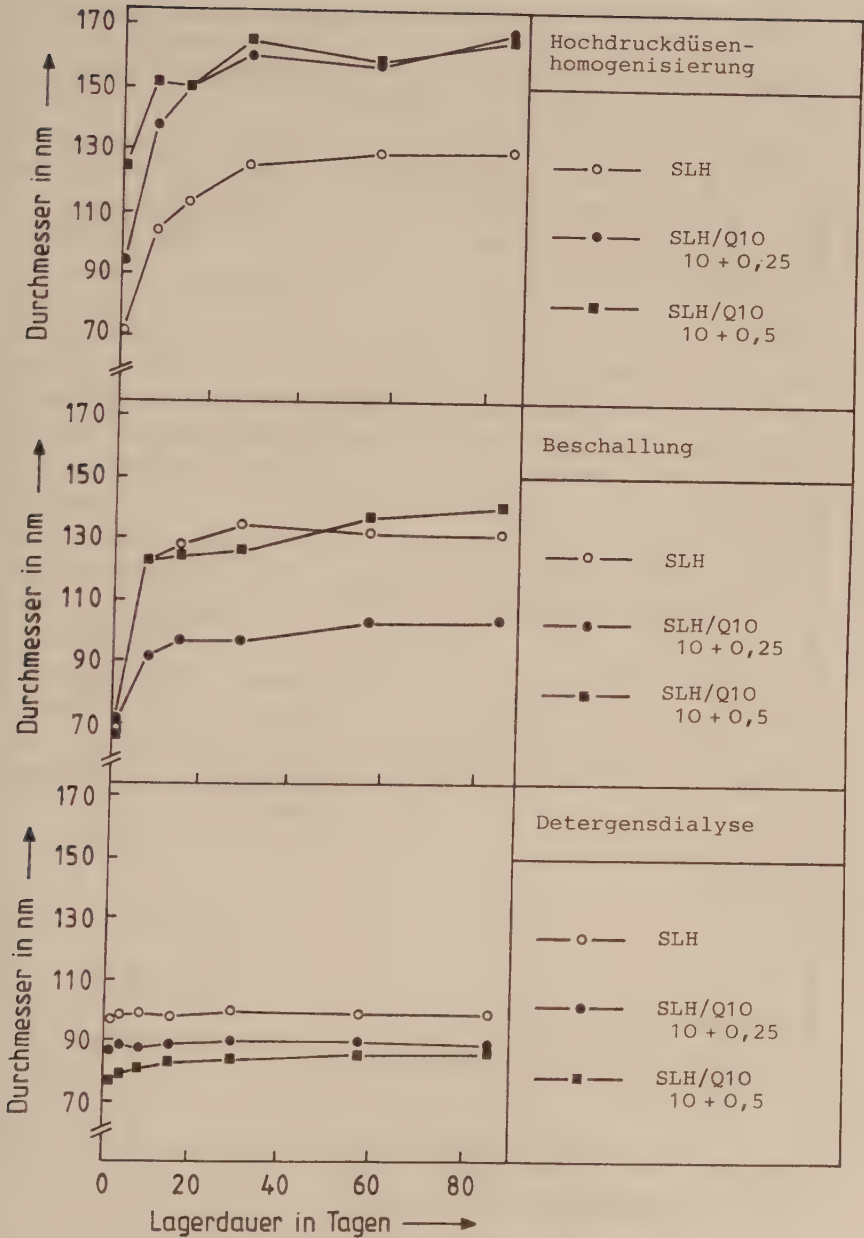


Abb. 28 Einfluß des Herstellungsverfahrens auf die Änderung des Vesikeldurchmessers während der Lagerung

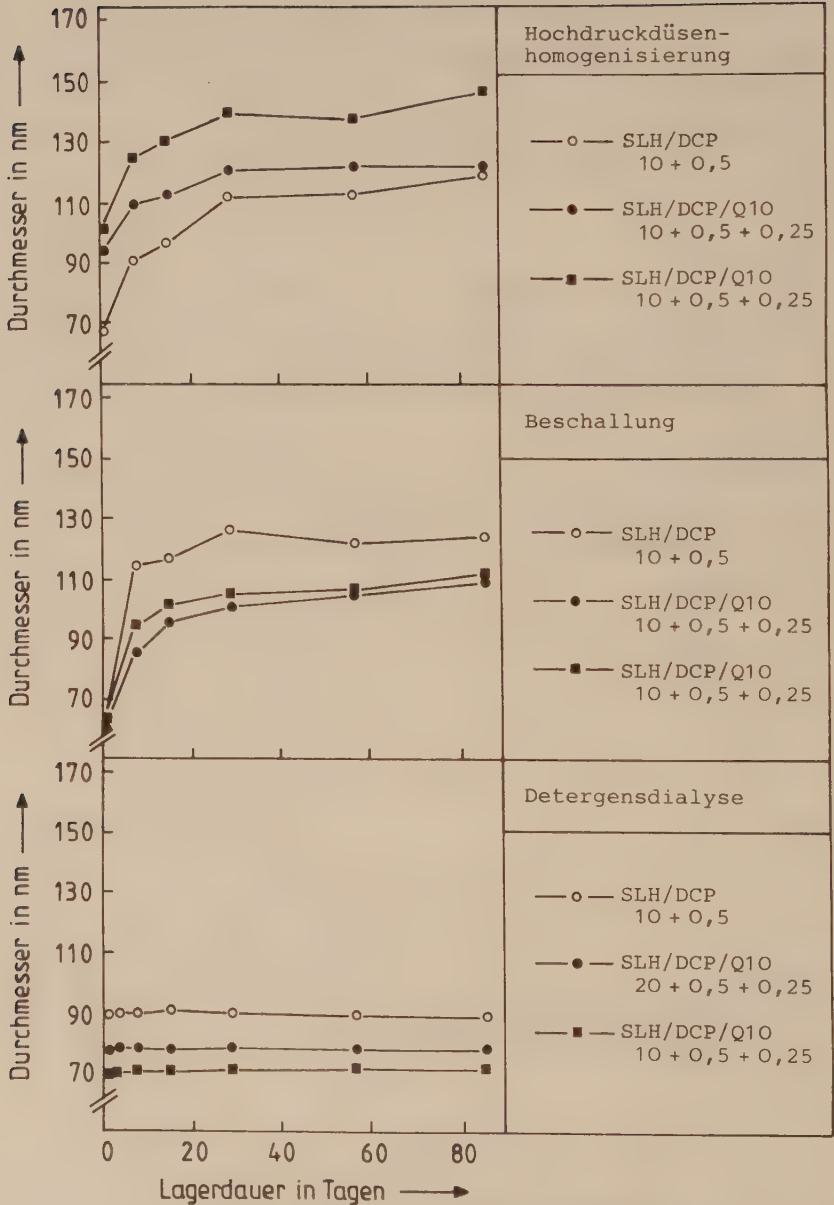


Abb. 29 Einfluß des Herstellungsverfahrens auf die Änderung des Vesikeldurchmessers während der Lagerung

Cholesterolhaltige Vesikel

Wie bereits erläutert, war die Herstellung von SLH-Vesikeln mit hohem Cholesterolanteil (50%) nur durch Beschallung und Hochdruckdüsenhomogenisierung möglich. Homogene Detergensdialyse-Vesikel wurden nur für Coenzym Q10-haltige Proben mit maximal 10% Cholesterol erhalten. Daraus ergibt sich eine bedingte Vergleichbarkeit der cholesterolhaltigen dialysierten Vesikel mit den Vesikeln aus den beiden anderen Verfahren.

Der Cholesterolzusatz führte zur nahezu vollständigen Stabilisierung aller in Abb. 30 dargestellten Zubereitungen. Dabei wurden sowohl die Unterschiede zwischen den Rezepturen unterschiedlichen Coenzym Q10-Gehaltes als auch die Unterschiede zwischen den Herstellungsverfahren nivelliert, abgesehen von Detergensdialyse-Vesikeln mit weniger als 5 Mol% Coenzym Q10. Als Unterschied verbleibt die höhere Polydispersität der düsenhomogenisierten Präparationen im Vergleich mit den anderen Zubereitungen, die während der 12-wöchigen Lagerung keine Änderung erfährt (nicht abgebildet).

Die hohe Sedimentationstendenz, die sich bei der visuellen Beurteilung der cholesterolhaltigen Vesikel während der Lagerung gezeigt hatte, hat offensichtlich auf die Tendenz zur Größenänderung keinen Einfluß.

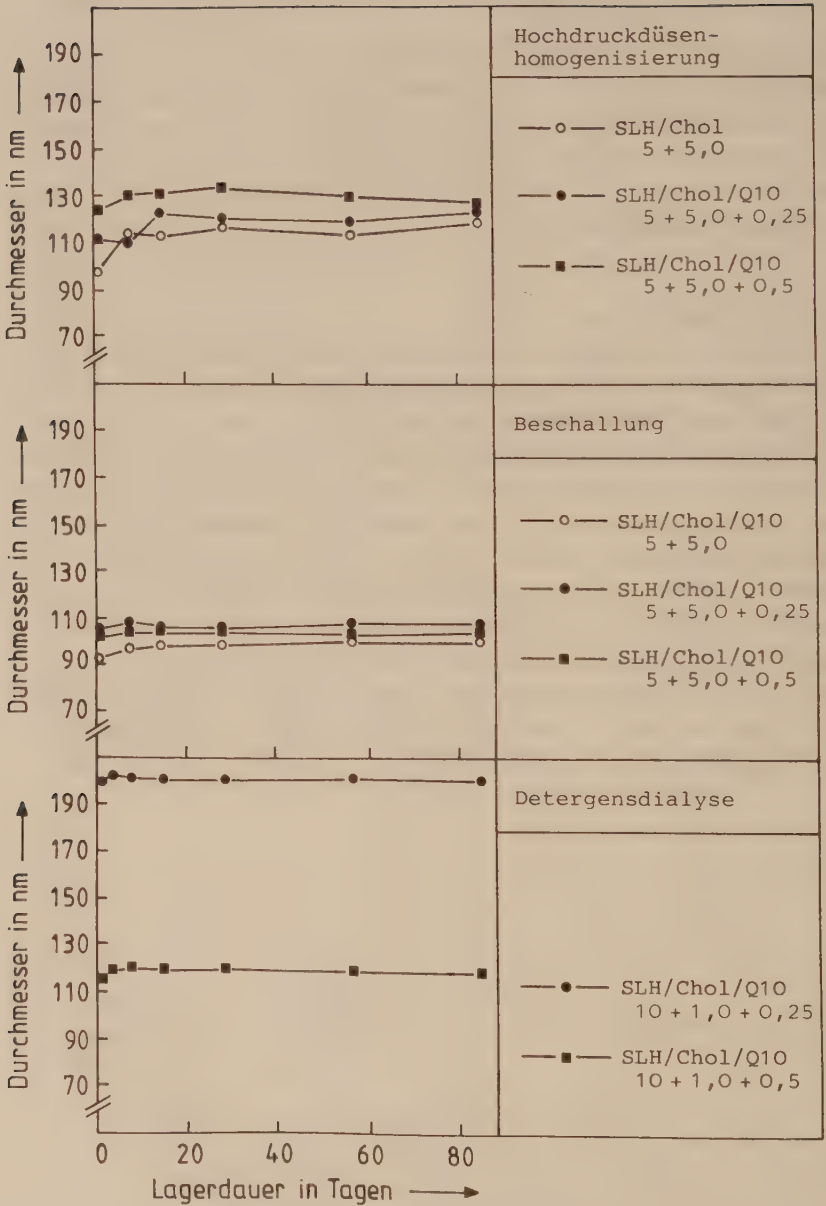


Abb. 30 Einfluß des Herstellungsverfahrens auf die Änderung des Vesikeldurchmessers während der Lagerung

3.4 Diskussion

In Relation zu den Änderungen der Vesikelgrößen der cholesterolfreien Präparationen aus den Verfahren der Hochdruckdüsenhomogenisierung und der Beschallung nehmen sich sämtliche Veränderungen, die an Detergendsialyse-Vesikeln festgestellt wurden, äußerst gering aus.

Detergendsialyse-Vesikel aus SLH und SL mit bis zu 5 Mol% Coenzym Q10 erwiesen sich bei einer Lecithinkonzentration bis zu 45 mg/ml über 12 Wochen als lagerstabil. Bei SLH-Vesikeln mit 5 Mol% Coenzym Q10 war zur Stabilisierung ein Zusatz von DCP oder Cholesterol notwendig, während bei einer Konzentration von 2,5 Mol% Coenzym Q10 auch lagerstabile SLH-Vesikel ohne die Inkorporation von Hilfsstoffen hergestellt werden konnten.

Für SLH-Vesikel kann die Stabilitätsaussage bei arzneistofffreien und Coenzym Q10-haltigen Zubereitungen bisher auf einen Zeitraum von 6 bis 10 Monaten erweitert werden. Die Lagerung ist dabei nicht nur auf 2°C beschränkt, sondern kann auch bei 20°C erfolgen.

Für die Lagerstabilität von SL-Vesikeln liegen neben dem 12-Wochen-Test nur Ergebnisse nach einer 2-jährigen Lagerung vor. Während sich reine SL-Vesikel über diesen Zeitraum hinweg vollkommen stabil verhalten, wurde bei Vesikeln mit 5 Mol% Coenzym Q10 eine leichte Verschlechterung der Qualität nach 2 Jahren festgestellt.

Bei SLH-Vesikeln mit 5 Mol% Coenzym Q10-Zusatz ist die bei der visuellen Beurteilung beobachtete Sedimentation mit einer Teilchengrößenänderung verbunden, während bei geringerer Coenzym Q10-Konzentration und bei arzneistofffreien SLH-Präparaten trotz Bodensatz keine Größen- oder Polydispersitätsänderungen feststellbar sind.

In der Literatur ist für Coenzym Q10 ein fusionsfördernder Effekt auf Liposomen beschrieben worden (75). Voraussetzung für Fusionsprozesse ist eine vorher erfolgte Aggregation (92), wie sie im sedimentierten Bodensatz angenommen werden kann. Die Erhöhung des Zetapotentials durch einen Einbau von 5 Mol% DCP

vermindert die Vesikelinteraktionen und vermag dadurch möglicherweise einen fusionsfördernden Effekt des Coenzym Q10 in SLH-Vesikeln auszugleichen.

Ebenso denkbar ist die Verminderung des fusionsfördernden Effektes des Coenzym Q10 durch veränderte Membraninkorporation des Arzneistoffs bei veränderter Membranpackung hervorgerufen durch einen Cholesterolzusatz.

Die hier beobachtete Inhibition von Fusionsprozessen bei arzneistofffreien beschallten Vesikeln durch Cholesterol ist mehrfach beschrieben (20,97). Der Effekt wird darauf zurückgeführt, daß Cholesterol während der Beschallung die Bildung von fusionsempfindlichen Fehlstellen in der Membran verhindert. Die Gefahr einer Bildung solcher Fehlstellen ist auch während der energiereichen MLV-Zerkleinerung bei der Hochdruckdüsenhomogenisierung zu erwarten.

Die Tatsache, daß bei einigen SLH-Rezepturen mit und ohne Cholesterol trotz beobachteter Sedimentation keine Größenänderungen auftreten, bekräftigt die im Rahmen der Messungen über Analytische Ultrazentrifugation aufgestellte Theorie einer verstärkten Sedimentation ohne verstärkte Vesikelwechselwirkung bei der Lagerung von Vesikeln mit hohem Sedimentationskoeffizienten.

IV. Beurteilung der Möglichkeiten und Grenzen eines Coenzym Q10-haltigen Liposomenpräparates zur Anwendung als Arzneimittel auf Grund der durchgeführten Untersuchungen

1. Überlegungen an Hand der Literatur zur Bioverfügbarkeit des liposomalen Coenzym Q10 am Zielorgan in Abhängigkeit von der Rezeptur

Das Ziel bei parenteraler Applikation der Coenzym Q10-haltigen Liposomendispersion ist es in erster Linie, einen hohen Arzneistoffspiegel im Herz zu erreichen.

In der Literatur ist gezeigt worden, daß dies mit SUV eher zu erreichen ist als mit MLV (13). Der ideale Arzneistoffträger sollte eine ausreichende Plasmastabilität aufweisen, um auf dem Wege des Blutkreislaufs zum Herz zu gelangen. Eine maximale Plasmastabilität hingegen könnte die Abgabe des Arzneistoffs aus der Vesikelmembran im Zielorgan verschlechtern.

Eine Reihe von Rezepturen unserer Untersuchung erfüllt die Anforderungen eines kleinen Vesikeldurchmessers und einer entsprechenden Homogenität und besitzt zusätzlich eine ausreichende Lagerstabilität, um als Arzneimittel in Frage zu kommen.

Es soll nun versucht werden, diese Rezepturen bezüglich ihrer zu erwartenden Plasmastabilität zu beurteilen. An Hand zahlreicher Studien und Übersichtsartikel, die die Zusammenhänge zwischen Vesikelzusammensetzung und Plasmastabilität zum Thema haben, so mit über 400 Zitaten bei SENIOR (19), lassen sich folgende Aussagen treffen:

Einfluß von Phasenübergangstemperatur und Membranfluidität

Eine geringe Membranfluidität und eine hohe Phasenübergangstemperatur bewirken verminderte Wechselwirkung der Vesikel mit membranabbauenden Plasmabestandteilen. Von den synthetischen Lipiden hat sich dabei Distearoylphosphatidylcholin (DSPC) als der Membranbaustein erwiesen, aus dem die stabilsten Membranen aufgebaut werden können.

Der Einbau von Cholesterol in die Membran bewirkt in jedem Fall eine verbesserte in vivo-Stabilität. Der Effekt ist jedoch bei gesättigten Lipiden weniger stark ausgeprägt als bei ungesättigten und jeweils maximal bei einem molaren Lipid/Cholesterol-Verhältnis von 1:1.

Diesen Überlegungen zu Folge müßten die in der vorliegenden Arbeit hergestellten cholesterolhaltigen SLH-Vesikel, deren Phosphatidylcholin mit 83% Stearoylsäureresten dem DSPC sehr nahe kommt, die höchste Plasmastabilität aufweisen, während die cholesterolfreien SL- und EL-Vesikel der stärksten Wechselwirkung mit Plasmabestandteilen ausgesetzt wären.

Einfluß des Vesikeldurchmessers

Der mittlere Durchmesser der homogenen Coenzym Q10-haltigen SLH/Cholesterol-Vesikel nach dem Detergensdialyse- und dem Beschallungsverfahren, die nach obigen Überlegungen die höchste Plasmastabilität besitzen müßten, liegt allerdings knapp über 100 nm. Dadurch ist im Präparat jeweils mit einem beträchtlichen Anteil an Vesikeln zu rechnen, die auf Grund ihrer Größe verstärkt der Phagozytose des Retikuloendothelialen Systems ausgesetzt sind.

Die cholesterolhaltigen Vesikel aus ungesättigtem Lipid und die cholesterolfreien Vesikel aus SLH nach dem Detergensdialyse-Verfahren vereinen eine zu erwartende mittlere Plasmastabilität mit einem mittleren Durchmesser unter 100 nm.

Einfluß der Oberflächenladung

Wird bei den cholesterolfreien SLH-Vesikeln der maximale stabil inkorporierbare Coenzym Q10-Zusatz von 5 Mol% gewählt, so ist zur Lagerstabilisierung ein Ladungsträgereinbau erforderlich. Vom pharmakokinetischen Standpunkt aus gesehen bewirken Ladungsträger in manchen Fällen eine verstärkte Wechselwirkung der Vesikel mit Zellen, was unter anderem wiederum zu einer verstärkten Abwanderung ins Retikuloendotheliale System führen kann. Somit könnten die äußerst homogenen ladungsträgerfreien SLH-Vesikel mit 2,5 Mol% Coenzym Q10-Zusatz eine günstigere in vivo-Verteilung besitzen.

2. Realisierbarkeit der Produktion und Qualitätssicherung eines Coenzym Q10-haltigen Injektionspräparates

Eignung von Verfahren zur Herstellung liposomaler und emulsoider Injektionspräparate im Produktionsmaßstab

Bedingt durch die unerwünschten Eigenschaften von Tensidsolubilisaten in bezug auf Toxikologie, Verteilungsverhalten und Metabolisierung, kommt neben der Inkorporation von Coenzym Q10 in kleine unilamellare Liposomen (SUV) nur eine Verarbeitung in emulsoider Form für ein Coenzym Q10-haltiges Injektionspräparat in Frage.

Eine Produktion größerer SUV-haltiger Chargen ist nur mit der Detergentsdialyse und der Hochdruckdüsenhomogenisierung möglich. Die Qualität der düsenhomogenisierten Produkte in unserer Untersuchung genügt nicht der Anforderung eines geringen, schmal verteilten Vesikeldurchmessers. Durch Aufarbeitungsschritte dürfte die Homogenität zwar verbessert werden; die Aufarbeitung behindert allerdings eine Herstellung größerer Chargen erheblich.

Coenzym Q10-haltige konventionelle Emulsionen besitzen einen Teilchendurchmesser im Bereich von 500 bis 1000 nm (10,11). Daraus resultiert neben einer geringen physikalischen Stabilität (98) unter Umständen ein ungünstiges Verteilungsverhalten (99). Deshalb können im Hinblick auf die parenterale Applikation von Coenzym Q10 vorzugsweise Mikroemulsionen eine Alternative zu SUV-Dispersionen darstellen.

Diese Systeme mit einem Teilchendurchmesser von 15 bis 50 nm werden in der Literatur durch Beschallung mit eintauchendem Stab hergestellt (12), wodurch sich wiederum das Problem einer mangelnden Übertragbarkeit auf größere Produktionsansätze stellt.

Sterilisierbarkeit der Präparate

Der in dieser Arbeit geforderte Vesikeldurchmesser von unter 100 nm macht eine Entkeimung durch Sterilfiltration möglich (71,100).

Bei aseptischer Produktion in Kombination mit Sterilfiltration ist in der Literatur bei corticoidhaltigen Vesikeln nach dem Detergendsialyse-Verfahren auch Pyrogenfreiheit nachgewiesen worden (71).

Bei Vesikeln aus hydriertem Sojalecithin ist über die Sterilfiltration hinaus eine Dampfsterilisation denkbar, da Coenzym Q10 eine ausreichende Thermostabilität besitzt (73) und bei Detergendsialyse-Vesikeln aus gesättigtem Lipid ein unveränderter Vesikeldurchmesser nach Autoklavierung bestimmt worden ist (22).

Bei den Vesikeldispersionen aus ungesättigtem Lipid mit Cholesterolzusatz käme unter Umständen auch das vor kurzem beschriebene Verfahren der Hochdrucksterilisation bei 40°C und 2000 bar als Alternative zur Sterilfiltration in Frage (101).

Lagerstabilität der Präparate

Das DAB 9 sieht unter dem Begriff "Injektionslösungen" nur Zubereitungen vor, die Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen beinhalten. Während bei Lösungen optische Klarheit gefordert wird und Emulsionen keine Anzeichen einer Phasentrennung zeigen dürfen, ist bei Suspensionen ein redispergierbares Sediment erlaubt. Allerdings dienen Suspensionen in der Regel nicht zur intravenösen Applikation (102), wie es bei der Coenzym Q10-haltigen Präparation vorgesehen ist.

Unsere Untersuchungen stellten heraus, daß die visuelle Beobachtung von Sedimentationserscheinungen nicht unbedingt mit einem Anwachsen der Teilchengröße in Zusammenhang stehen muß. Dennoch stellt die Schlieren- oder Bodensatzbildung ein Risiko dar:

- o Die Prüfung auf partikuläre Verunreinigungen ist erschwert.
- o Vor der Applikation muß aufgeschüttelt werden.

- o Der Übergang von Aggregationsprozessen in Fusionsprozesse bei einer bisher nicht erfolgten Lagerdauer über mehrere Jahre hinweg muß befürchtet werden.

Unter diesen Aspekten betrachtet, ist einer SLH-Rezeptur mit 2,5 Mol% Coenzym Q10 und 10 Mol% Ladungsträger der Vorrang zu geben, bei der in der vorliegenden Untersuchung keine Schlieren- oder Bodensatzbildungen während der Lagerung beobachtet werden konnten.

Diese Rezeptur besitzt den zusätzlichen Vorteil einer Stabilität gegen Autoxidationsprozesse. Dadurch muß die Produktion nicht unter Inertgas durchgeführt werden und eine Lagerung bei 20°C dürfte möglich sein, wie es die stabile 20°C-Lagerung der entsprechenden Rezeptur mit 5 Mol% DCP nahelegt.

Eine Erhöhung der Coenzym Q10-Konzentration bei SLH-Vesikeln geht entweder mit Schlierenbildung während der Lagerung oder mit einer Verschlechterung der Homogenität einher.

In der Literatur wird in manchen Fällen die Stabilität von Liposomen dadurch erhöht, daß die Langzeit-Lagerung in gefriergetrocknetem Zustand erfolgt. Während diese Stabilisierung für Vesikel mit einem Durchmesser über 200 nm unter Umständen möglich ist (103), scheint es bisher nicht gelungen zu sein, bei der Redispergierung von gefriergetrockneten Vesikeln mit einem Ausgangs-Durchmesser unter 100 nm erneut eine Vesikelpopulation mit geringem Vesikeldurchmesser zu erhalten (42,104).

Realisierbarkeit therapeutisch anwendbarer Coenzym Q10-Konzentrationen

In Japan ist Coenzym Q10 in Form von Oralia im Handel, wobei die gebräuchliche Dosierung 3mal täglich 10 mg beträgt (9). Studien zur Wirksamkeit dieser Dosis sind nur in seltenen Fällen unter Bestimmung von resorbierten Arzneistoffmengen durchgeführt worden (105). Dabei wurde jeweils der Plasmaspiegel von Coenzym Q10 gemessen, der mit kardialen Funktionen korrelierbar war. Die Verteilung und Umverteilung von Coenzym Q10 in verschiedene Kompartimente (106) in Zusammenhang mit dem

Vorliegen von endogen synthetisiertem Coenzym Q10 lassen die Auswertung von Plasmaspiegelkurven äußerst komplex werden. Angaben zur absoluten Bioverfügbarkeit oraler Gaben oder zur therapeutischen Dosierung bei intravenöser Applikation sind über die Literatur nicht zugänglich.

Deshalb soll hier die absolute Bioverfügbarkeit von α -Tocopherolacetat, das vom chemischen Aufbau her dem Coenzym Q10 sehr ähnlich ist, zur Abschätzung der Beziehung zwischen oraler und intravenöser Dosis dienen:

In Abhängigkeit von der oral zugeführten Dosis beträgt die absolute Bioverfügbarkeit von α -Tocopherolacetat 20 bis 40% (107). Wird diese Bioverfügbarkeit auf Coenzym Q10 übertragen, so müßten von der oralen Tagesdosis von 30 mg intravenös 6 bis 12 mg appliziert werden, sofern eine eventuell günstigere Verteilung und Metabolisierung der liposomalen Gabe im Vergleich zum gastrointestinal resorbierten Coenzym Q10 außer acht gelassen wird.

Eine liposomale Präparation mit zu erwartender optimaler Sterilisierbarkeit und Lagerfähigkeit ist nach den obigen Überlegungen auf einen Coenzym Q10-Zusatz von 2,5 Mol% beschränkt, entsprechend einer Coenzym Q10-Konzentration von 0,72 mg/ml im Endprodukt.

Eine Applikation von 6 bis 12 mg Coenzym Q10 in Form dieser Vesikeldispersion würde ein Injektionsvolumen von ca. 8 bis 16 ml erfordern, so daß eine Therapie über diese liposomale Zubereitung durchaus realisierbar erscheint.

Die Schlußfolgerung, daß eine Coenzym Q10-Konzentration von 0,72 mg/ml therapeutisch anwendbar ist, wird zusätzlich dadurch gestützt, daß in der Literatur bei Zubereitungen in Form von Tensidsolubilisaten und Emulsionen zur i.v.-Injektion von Coenzym Q10 im allgemeinen eine Arzneistoffkonzentration von 0,6 bis 1,0 mg/ml angegeben wird (10,69,72).

C. Experimenteller Teil

Von allen in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurde, sofern nicht anders erwähnt, p.a.-Qualität eingesetzt.

Alle Arbeitsschritte an ungesättigten Lipiden und an Coenzym Q10-haltigen Ansätzen wurden unter Lichtschutz durchgeführt, um Zersetzungsreaktionen (83,108) zu vermeiden.

I. Herstellung der Liposomen

1. Geräte

Lipoprep II mit Dialyse-Membranen 10.17; Fa. Dianorm, München
Branson Sonifier W-250 mit flacher Arbeitsspitze; Fa. Branson, Danbury, USA

Microfluidizer M-110 Typ S; Microfluidics Corp., Newton, USA

Rotationsverdampfer Rotavapor R; Fa. Büchi, Flawil, Schweiz

Gasballastvakuumpumpe D2; Fa. Leybold, Köln

Ultraschallbad Sonorex RK 510; Fa. Bandelin, Berlin

Ultrazentrifuge Spinco Modell L mit Rotor Typ 65; Fa. Beckman, München

Beschallungsgefäß aus Glas, 20 x 75 mm; Sonderanfertigung

Dreikantmagnetührkern Nr. 137815; Fa. Rudolf Brand, Wertheim

PTFE-Dichtband 0,1 mm, 10 mm breit; Fa. Rudolf Brand, Wertheim

ATMOSBAG AO782; Fa. SIGMA, Deisenhofen

2. Materialien

Braunglasinjektionsflaschen 10 ml, 13 mm Kopf mit Gummistopfen V9024 und Bördelkappen; Fa. Müller + Müller-Joh., Holzminden*)

Sojalecithin Epikuron 200, Charge 3-4-5080, mind. 95% Phosphatidylcholin, max. 4% Lyso-Phosphatidylcholin, stab. mit 0,2% (G/G) α -Tocopherol; Fa. Lucas Meyer, Hamburg*)

Hydriertes Sojalecithin Epikuron 200 H, Charge 3-7-5002, 95,2%

*) Den Herstellern danken wir für die Überlassung von Versuchsmustern

Phosphatidylcholin, 2,5% Lysophosphatidylcholin; Fa. Lucas Meyer, Hamburg
Eilecithin PC-Ei Charge 12018, mind. 98% Phosphatidylcholin; Fa. Lipoid KG, Friedrichshafen*)
Phosphatidylserin BC-PS Charge 110, Fa. FIDIA, Abano Terme, Italien*)
Coenzym Q10, Charge 81-098 und 021010, Gehalt mind. 99,6%; Fa. Zyma, München*)
Cholesterol purum; Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
L- α , γ -Dimyristoyl- α -phosphatidsäure-Dinatriumsalz purum; Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
Cholsäure Natriumsalz für biochemische Zwecke; Fa. Merck, Darmstadt
D-Sorbit mind. 98%; Fa. Roth, Karlsruhe

Von den oxidationsempfindlichen ungesättigten Lipiden wurde jeweils eine größere Menge in N₂-begastem Methanol gelöst, in einem Stickstoffzelt (ATMOSBAG) volumenportioniert und die Portionen bis zum Verbrauch bei -30°C gelagert. Dem Eilecithin wurde vor der Portionierung 0,2% (G/G) α -Tocopherol zugesetzt.

Das Cholesterol wurde vor der Verwendung 2mal aus Methanol umkristallisiert.

Die Sojalecithine und das Eilecithin wurden in Abständen dünn-schichtchromatographisch auf Lysolecithinbildung untersucht (20). Im Untersuchungszeitraum konnte semiquantitativ keine Zunahme des Lysolecithingehaltes festgestellt werden.

*) Den Herstellern danken wir für die Überlassung von Versuchsmustern.

Pufferlösungen pH 7,4 (10 mM Phosphat)

mit NaCl ($\mu = 0,154$)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,65 g
NaCl	7,16 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,37 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

mit Sorbit ($\mu = 0,03$)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,12 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,62 g
Sorbit	43,89 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,37 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

3. Durchführung

3.1 Detergensdialyse-Verfahren

Herstellung der Mischmizelllösung

Das Lipid (270 mg bis 540 mg) wurde zusammen mit Natriumcholat und je nach Rezeptur Coenzym Q10, Ladungsträger und Cholesterol in 10 bis 20 ml einer Mischung aus Chloroform/Methanol (2:1 V/V) gelöst. Bis auf die Ansätze aus ungesättigtem Lipid mit Ladungsträger, bei denen ein molares Lipid/Cholat-Verhältnis von 0,6 gewählt werden mußte, wurden sämtliche Rezepturen mit einem Lipid/Cholat-Verhältnis von 0,8 angesetzt.

Vorversuche hatten in Übereinstimmung mit Befunden in der Literatur (74) gezeigt, daß der Wechsel des Lipid/Cholat-Verhältnisses in diesem Bereich keinen Einfluß auf den Vesikeldurchmesser ausübt.

Das Lösungsmittelgemisch wurde innerhalb von 15 Min. in einem 1l-Rundkolben unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) am Rotationsverdampfer abgezogen, so daß an der Kolbenwand ein einheitlicher Lipid-Film zurückblieb.

Bedingungen:

SL- und EL-Rezepturen: 35°C unter N_2

SLH-Rezepturen: 50°C

Die Lipidfilme wurden im Vakuum (mindestens 10^{-2} Torr) bei Raumtemperatur nachgetrocknet.

Bedingungen:

SL- und EL-Rezepturen: 2 h

SLH-Rezepturen: 12 h

In 9 ml membranfiltriertem Puffer wurden die Lipidfilme aufgelöst.

Bedingungen: SL- und EL-Rezepturen: N₂-begaster Puffer, Raumtemperatur

SLH-Rezepturen: Temperierung auf 60°C

Sofern nicht anders erwähnt, wurde der NaCl-haltige Puffer eingesetzt.

Für die Untersuchungen zur Lipidoxidation fand zusätzlich ein entsprechender NaCl-haltiger Puffer ohne Di-Natrium-EDTA Anwendung.

Die Mischmizellösungen klärten sich sofort und wurden anschließend im vorbereiteten Lipoprep-Gerät verarbeitet.

Verarbeitung im Lipoprep-Gerät

Der Aufbau des gesamten Lipoprep-Gerätes ist in Abb. 31 dargestellt. Abb. 32 zeigt die Zusammensetzung des Tripelzelldialysators mit Metallstütznetzen und Schlauchfittings aus V4A-Stahl. Anstelle des mitgelieferten Magnetrührkerns wurde ein Dreikantkern verwendet, der genau eingepaßt werden konnte. Dadurch konnte ein die Stütznetze schädigendes Taumeln während des Rührens in vertikaler Lage vermieden werden. Stütznetze, Fittings und Rührkern mußten regelmäßig ausgewechselt werden, um Korrosionsprozesse zu umgehen.

Die Membranen wurden vor dem Einbau in destilliertem Wasser gequollen, mehrmals gespült und in Puffer äquilibriert. Es wurden jeweils 7 ml Mischmizellösung in das Mittelkompartiment eingefüllt. Der Dialysierpuffer wurde vor der Verwendung in einem Ultraschallbad unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) entgast. Für die Versuche zur Lipidoxidation wurde der EDTA-freie Puffer zusätzlich mit Stickstoff begast.

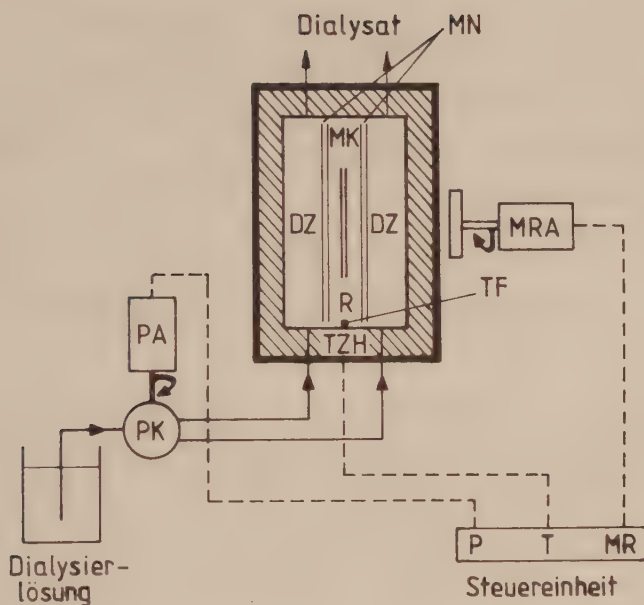


Abb. 31 Schematische Darstellung der Dialyse-Apparatur

- DZ : Durchflußzelle
- MN : Membran auf Stütznetz
- MK : Mittelkompartiment
- MRA: Magnetrührantrieb
- MR : Magnetrührsteuerung
- P : Pumpensteuerung
- PA : Pumpenantrieb
- PK : Pumpenköpfe
- R : Magnetrührer
- T : Temperatursteuerung
- TF : Temperaturfühler
- TZH: Thermostatisierter Zellhalter

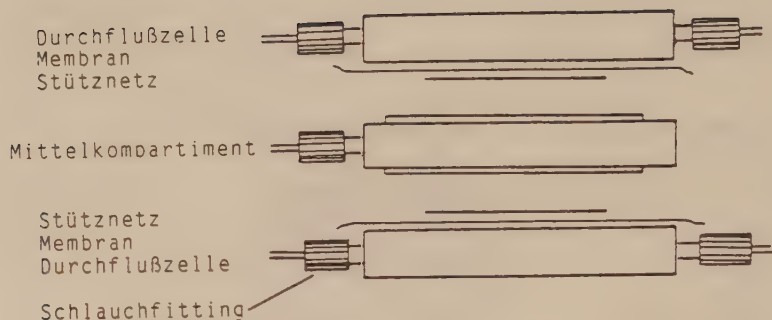


Abb. 32 Schematische Darstellung der Zusammensetzung der Tripeldialysezelle des Lipoprep-Geräts

Als Pumpgeschwindigkeit wurde in beiden Durchflußzellen 1 ml/min gewählt. Bei ungesättigten Lipiden erfolgte die Dialyse in einem Klimaraum bei 22°C über 22 h. Für SLH-Rezepturen wurde eine Dialyse-Temperatur von 60°C über 20 h gewählt mit einer anschließenden Abkühlungsphase über 2 h.

SL- und EL-Rezepturen wurden nach der Dialyse dem Gerät entnommen, mit einem 0,2 µm Membranfilter in N₂-begaste Injektionsfläschchen filtriert und verbördelt.

SLH-Zubereitungen wurden nach der Dialyse mit 1,5 ml Puffer im Mittelkompartiment verdünnt und durch einen 0,45 µm Membranfilter in das Injektionsfläschchen filtriert.

Der Restcholatgehalt der Vesikelpräparationen nach der Dialyse wurde nicht bestimmt. Bei der erhaltenen Vesikelhomogenität kann jedoch von einem Restcholatgehalt unter 0,3 mg/ml ausgegangen werden (20).

Die im Ergebnisteil angegebene Standardabweichung des mittleren Durchmessers einzelner Chargen wurde bei SLH/DCP/Q10-Vesikeln (10 + 0,5 + 0,25; LK: 30 mg/ml) ermittelt.

3.2 Beschallungsverfahren und Hochdruckdüsenhomogenisierung

Für beide Verfahren wurden zunächst MLV hergestellt:

Die für ein Puffervolumen von 9 ml ausreichende Menge an SLH, Cholesterol, Ladungsträger und Coenzym Q10 wurde in 10 ml Chloroform gelöst. Die Bildung eines Lipidfilmes und die Nach-trocknung erfolgten entsprechend den Bedingungen bei der De-tergentsdialyse.

Unter Temperierung auf 60°C wurde der Film nach Zugabe von 9 ml filtriertem Puffer mit Hilfe eines Magnetrührkerns von der Kolbenwand abgelöst. Die entstehende MLV-Dispersion wurde an-schließend 1 h bei 60°C äquiliibriert.

Beschallung

7 ml MLV-Dispersion wurden unter Temperierung auf 60°C 10 Minu-ten auf Stufe 10 beschallt (Duty Cycle 70%, Abdichtung des Ge-fäßes mit Teflonband). Anschließend wurden verbleibende MLV und der Titanabrieb 40 Minuten bei 40.000 UPM abzentrifugiert. Die Wahl der Parameter war in Vorversuchen optimiert worden. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µm-Membranfilter ins Lager-gefäß filtriirt.

Hochdruckdüsenhomogenisierung

7 ml der auf 60°C temperierten Dispersion wurden im Microflui-dizer-Gerät ohne Temperierung bei einem Druck von 980 bar 25 Homogenisierungszyklen unterworfen. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der Zahl der Homogenisierungszyklen zu einer Verschlechterung der Vesikelqualität führt.

Nach einem Membranfiltrationsschritt (0,2 oder 0,45 µm) er-folgte die Abfüllung ins Lagergefäß.

II. Methoden zur Charakterisierung der Vesikel

1. Dynamisches Laser-Light-Scattering

Geräte und Materialien

Laser-Light-Scattering-Gerät Autosizer IIc mit 64 Kanal-Korrektor und Autosizer Software Vsn. 3.2; Fa. Malvern, Malvern, England

Olivetti Computer M24; Fa. Olivetti, Ivrea, Italien

Oki Microline 192 Drucker; Fa. Okidata, Düsseldorf

Viereckkunststoffküvetten 1 x 1 cm; Fa. Sarstedt, Ulm

Laser-Light-Scattering-Gerät System 4700c^{*)}; Fa. Malvern, Malvern, England

Durchführung

Die Proben wurden mit dem jeweiligen membranfiltrierten Dispersionspuffer soweit verdünnt, daß bei Blendeneinstellung 100 und Küvettentemperatur auf 20°C ca. 50.000 bis 100.000 counts/sec vom Gerät (Autosizer IIc oder System 4700c mit Meßwinkel 90°) angezeigt wurden. Bei einer Meßzeit von 150 sec wertet das Gerät für eine Durchmesserbestimmung 10 Meßläufe aus. Aus jeweils zwei solcher Serienergebnisse wurde der Mittelwert des z-average-Durchmessers gebildet.

Für die Bestimmung der Durchmesser der sorbithaltigen Zubereitungen und der Mischmizellösungen mußte eine größere Blende gewählt werden (200 bis 300). Die SLH-haltigen Mischmizellösungen wurden bei 55°C vermessen.

Für die Bestimmung des z-average-Durchmessers ergab sich bei der Vermessung eines monodispersen Eichlatex (ϕ 85 nm) an 6 verschiedenen Tagen mit jeweils neu hergestellten Verdünnungen eine relative Standardabweichung von 0,43%. Der Mittelwert des dazugehörigen niedrigen Polydispersitätsindexes betrug $0,03 \pm 0,01$.

^{*)} Herrn Dipl.-Ing. B. Köpfer, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung von Vorversuchen am System 4700c im Biochemica Forschungszentrum Tutzing.

2. Gelchromatographie

Geräte und Materialien

Chromatographiesäulen Typ G, 10 x 500 mm mit verstellbarem Adapter und Kühlmantel; Fa. Amicon, Witten
Probenschleife aus zwei 4-Wege-Hähnen LV-4; Fa. Pharmacia, Freiburg
Fractionensammler FRAC-100 und Pumpe P-1; Fa. Pharmacia, Freiburg
UV-Detektor BT 3030; Fa. Biotronic, Frankfurt
Omniscribe-Zweikanalschreiber Type B 5217-3; Fa. Kontron, Eching bei München
Fractogel TSK HW-75 (F); Fa. Merck, Darmstadt
Sephacryl S-1000 Superfine; Fa. Pharmacia, Freiburg

Eichpartikel (Größenangabe laut Hersteller):

Unisphere Latex aus Polystyrol: Nr. 11, 12, 20 (ϕ 120 nm, 233 nm, 510 nm); Fa. Serva, Heidelberg

Unisphere Latex aus Styrol-Butadien-Copolymer mit Carboxylgruppen: Nr. 14 (ϕ 220 nm); Fa. Serva, Heidelberg

Dow Latex aus Polystyrol: ϕ 85 nm $\pm$ 6 nm und 173 nm $\pm$ 7 nm; Fa. Serva, Heidelberg

Rinder-Thyroglobulin zur Molekulargewichtsbestimmung; Fa. SIGMA, Deisenhofen

Durchführung

Die Säulen wurden sowohl zur Säulenpackung als auch zur Elution von Proben auf 20°C temperiert. Vor dem Packen wurde vom gequollenen Gelmaterial durch mehrfaches Dekantieren eines Überstandes ein störender Feinanteil abgetrennt.

Fractogel TSK HW-75 wurde bei einem Packfluß von 85 cm/h gepackt, Sephadryl S-1000 bei 40 cm/h. Die Gelbettdimension betrug in beiden Fällen 1 x 47 cm. Eluiert wurden beide Säulen mit einer Flußrate von 12,5 cm/h ($\hat{=}$ 10 ml/h).

Das Probenvolumen der Probenschleife betrug ca. 0,2 ml. Die Chromatographie erfolgte mit dem EDTA-haltigen Puffer (siehe Liposomen-Herstellung). Bei der Eichung mit Latexpartikeln wurde zur Verhinderung von Aggregationsprozessen 10 mM Natriumlaurylsulfat zugesetzt (46). Um sicherzustellen, daß dieser Zusatz keinen Einfluß auf das Elutionsverhalten hat, wurde Thyroglobulin ϕ 17 nm (109) in die Eichung einbezogen, bei dem der Natriumlaurylsulfatzusatz entfiel.

Je nach UV-Spektrum der zu chromatographierenden Probe wurde die Elution bei einer Wellenlänge von 223 nm bis 275 nm aufgezeichnet. Die Lage der Peakmaxima V_e wurde über den an den UV-Detektor angeschlossenen, programmierbaren Fraktionensammler bestimmt. Die Ermittlung des Gesamtvolumens V_t erfolgte durch Auswertung des Elutionsprofils von Natriumazid bei 230 nm. Das Ausschlußvolumen V_o ergab sich aus der Chromatographie von Unisphere Latex 20. Mit diesen Größen konnte das Komplement des Verteilungskoeffizienten $(1 - K_d)$ errechnet werden:

$$(1 - K_d) = 1 - \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Mit Hilfe eines mathematischen Tabellenwerkes (110) wurde anschließend das Inverse der Error-Funktion von $(1 - K_d)$ ermittelt: $\text{inv}(\text{erf}(1 - K_d))$. Für diese Größe ist von ACKERS (50) semiempirisch eine lineare Beziehung zum Teilchendurchmesser gefunden worden.

Während für $(1 - K_d)$ -Werte bis ca. 0,7 die Bildung des Inversen der Error-Funktion nur eine geringe Wertänderung (ca. 5%) bewirkt, bedeutet die Annäherung von $(1 - K_d)$ an den Maximalwert von 1 einen steigenden Unterschied zwischen $(1 - K_d)$ und $\text{inv}(\text{erf}(1 - K_d))$: Für einen $(1 - K_d)$ -Wert von 0,952 beträgt der $\text{inv}(\text{erf}(1 - K_d))$ -Wert beispielsweise 1,40, so daß geringe Unterschiede im Elutionsvolumen großen Einfluß auf die Auswertung ausüben.

in der Regressionsanalyse der Eichwerte wurden die Ergebnisse für den Latex mit 233 nm Durchmesser nicht mit einbezogen. Der Korrelationskoeffizient für die restlichen Eichwerte betrug

O,9997 für Fractogel TSK HW-75 und O,9985 für Sephacryl S-1000.

Die Vesikelpuben wurden vor der Chromatographie 1 : 2 verdünnt. Um eine in der Literatur beschriebene Retardierung von Ve durch Lipidadsorption am Gelmaterial zu vermeiden (46), wurden vor der Größenbestimmung der Vesikel die geeichten Säulen durch mehrfache Chromatographie von Vesikelpuben äquilibriert.

Bei einem Vesikeldurchmesser von 98 nm betrug anschließend die relative Standardabweichung aus 6 Bestimmungen 1,4%.

Im Ergebnisteil wurde erwähnt, daß die sorbithaltigen Vesikelpuben trotz eines relativ hohen Polydispersitätsindex (0,2 bis 0,3) als einheitliche Fraktion eluiert wurden. In Abb. 33 ist das Elutionsprofil einer solchen Probe an Sephacryl S-1000 dargestellt.

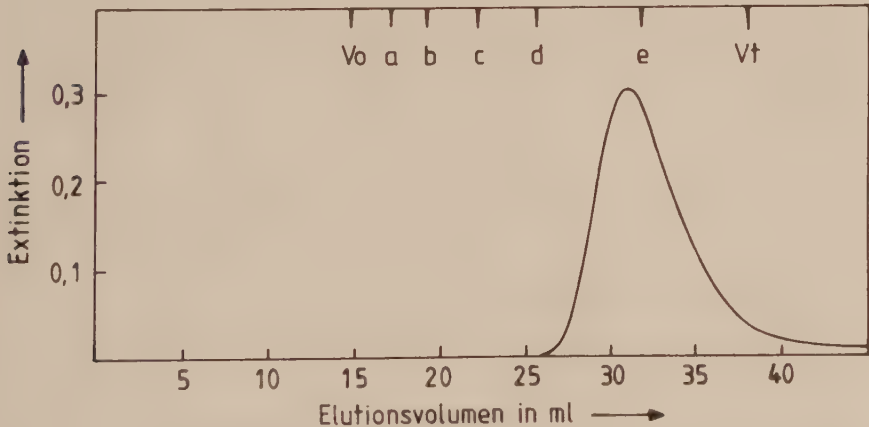


Abb. 33 Elutionsprofil von Coenzym Q10-haltigen SL-Vesikeln an Sephacryl S-1000 ($\lambda = 223 \text{ nm}$) (SL/Q10 10 + 0,5; LK: 30 mg/ml; isotonisiert mit Sorbit)

Eichmarkierungen:

- a: 220 nm
- b: 173 nm
- c: 120 nm
- d: 85 nm
- e: 17 nm

3. Elektronenmikroskopie

Gerät

Siemens Elmiskop 101; Fa. Siemens, München

Durchführung

Verfahren I:

Die Vesikelprobe wurde mit Wasser 1:10 verdünnt, auf Kolloidiumfolie aufgetragen und nach dem Antrocknen mit Phosphorwolframsäure nachkontrastiert.

Verfahren II:

Die unverdünnte Vesikelprobe wurde zusammen mit Phosphorwolframsäure auf Graphitoxid aufgetropft und getrocknet.

Bei den SLH-haltigen Proben wurden mit beiden Verfahren die gleichen Ergebnisse erzielt, im Gegensatz zu den Proben aus ungesättigtem Lipid, bei denen Verfahren I bessere Abbildungen lieferte.

Es wurde eine 80.000fache Vergrößerung gewählt.

4. Analytische Ultrazentrifugation

Gerät

Analytische Ultrazentrifuge Modell E mit UV-Detektor; Fa. Beckman, München

Durchführung

Es wurden apparente, das heißt nicht auf rein wäßrige unendliche Verdünnung umgerechnete Sedimentationskoeffizienten ($s_{app.}$) bei 20°C bestimmt unter Verdünnung der Proben mit Dispersionspuffer. Die UV-Detektion erfolgte bei 260 bis 280 nm

gegen eine mit reinem Puffer gefüllte Zentrifugenzelle. Die Abstände zwischen den Momentaufnahmen des Extinktionsverlaufs betrugen 4 bis 8 Minuten. In die bei ELIAS (59) beschriebene Auswertung wurden jeweils mindestens 10 Momentaufnahmen einbezogen. Weitere Versuchsparameter sind der Tab. 3 zu entnehmen.

Ein gerätebedingtes "Rauschen" der Absorptionssaufzeichnung macht sich in Abb. 17A in Form schmaler Spitzen bemerkbar, die bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

$s_{app.}$ kann aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Vesikelfront während der Zentrifugation errechnet werden:

$$s_{app.} = \frac{dr/dt}{\omega^2 \times r}$$

ω : Winkelgeschwindigkeit
 r : Abstand vom Rotationszentrum

Der Zusammenhang zwischen $s_{app.}$ und dem apparenten Partikelgewicht ($PG_{app.}$) ergibt sich folgendermaßen:

$$PG_{app.} = \frac{R \times T \times s_{app.}}{(1 - v^* \times \rho_1) \times D_2}$$

R : allgemeine Gaskonstante

T : Temperatur in Kelvin

v^* : partielles spezifisches Volumen der Vesikel

ρ_1 : Dichte des Dispersionsmittels

D_2 : Diffusionskoeffizient der Vesikel

5. Bestimmung des Lipidgehaltes

Geräte und Materialien

Uvicon 810 Spectrophotometer, Anacomp 220 Rechner; Fa. Kontron, Eching bei München

Aluminiumblock mit 5 cm tiefen Bohrungen zur Aufnahme von Reagenzgläsern (1,5 x 10 cm); Sonderanfertigung

Heizplatte IKA-Combimag RCT; Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen im Breisgau

Einwegküvetten aus Kunststoff, 10 mm Schichtdicke; Fa. Müller ratiolab, Dreieich

Phosphatbestimmungs-Kit; Fa. Serva, Heidelberg

Perhydrol H_2O_2 30%; Fa. Merck, Darmstadt

Dipalmitoyl-DL- α -Phosphatidylcholin 99%; Fa. SIGMA, Deisenhofen

Durchführung

Das Phosphatbestimmungs-Kit beruht auf der Methode nach EIBL und LANDS (111): Nach Überführung des organische gebundenen Phosphors in anorganisches Phosphat erfolgt die UV-spektroskopische Bestimmung einer durch Phosphomolybdat hervorgerufenen Trübung, die sich in Gegensatz von Schwefelsäure, Ammoniummolybdat und Triton X-100 bildet.

Die Vorschrift wurde von uns in ähnlicher Weise abgewandelt, wie in der Literatur beschrieben (62): Die Proben (ca. 60 nM Phosphor: 100 μl einer 1:100-Verdünnung der Vesikeldispersion) wurden mit der Schwefelsäure 10 min bei 300°C im Alublock aufgeheizt. Nach Entfernung aus dem Alublock erfolgte sofortige Zugabe von 60 μl Perhydrol. Anschließend wurden die Proben 30 min auf 300°C gehalten. Der restliche Vorgang entsprach der mitgelieferten Gebrauchsanweisung des Kits.

Mit 99%igem DPPC wurde eine Eichgerade im Bereich von 30 nM bis 90 nM Phosphor erstellt (Korrelationskoeffizient: 0,9992; relative Standardabweichung bei 9 Bestimmungen gleichen Gehalts: $\pm 2,36\%$).

Für jede Gehaltsbestimmung wurden drei Einzelbestimmungen gemittelt.

Da die Vesikelp Proben in phosphathaltigem Puffer dispergiert waren, mußte für den Lipidgehalt vom Gesamtphosphatgehalt der separat bestimmte Phosphatbeitrag des Puffers abgezogen werden. Der Lipidgehalt der Vesikelprobe wurde jeweils bezogen auf den Phosphorgehalt der eingesetzten Lipide vor der Verarbeitung.

Bei DCP-haltigen Proben gibt der Lipidgehalt die Summe aus DCP und Lecithin an.

6. Bestimmung des Coenzym Q10-Gehalts

Geräte und Materialien

Uvicon 810 Spectrophotometer, Anacomp 220 Rechner, Plotter 800; Fa. Kontron, Eching bei München

Küvetten QS 100, 10 mm Schichtdicke; Fa. Hellma, Müllheim/Baden
Branson Sonifier W-250 mit Mikrospitze; Fa. Branson, Danbury, USA

Extrelut 1 - Säulen; Fa. Merck, Darmstadt

Chloroform für die UV-Spektroskopie; Fa. Merck, Darmstadt

Durchführung

Nach Vorversuchen erwies sich folgendes Verfahren zur quantitativen Erfassung des Arzneistoffs als geeignet:

0,3 ml Coenzym Q10-haltige unverdünnte Liposomendispersion wurde auf die Extrelut-Säule aufgetragen. Nach 30 Minuten Einwirkzeit wurde 3mal mit je 6 ml Chloroform in einen 25 ml-Meßkolben eluiert. Die Säulen wurden über Nacht stehengelassen und erneut mit 6 ml Chloroform eluiert.

Der auf 25 ml aufgefüllte Chloroformextrakt wurde anschließend gegen eine Blindprobe (Chloroformextrakt aus entsprechender arzneistofffreier Probe) bei 275 nm im Spektralphotometer vermessen. Die Auswertung erfolgte über eine Eichgerade von Coenzym Q10 in Chloroform.

Standardabweichung der Bestimmung: $\pm 0,4\%$ ($n = 10$)

Bestimmung der Wiederfindungsrate:

Da die Produktion von Detergentsdialyse-Liposomen in einem offenen System erfolgt und somit keine Charge mit bekanntem Coenzym Q10-Gehalt hergestellt werden kann, wurde die Bestimmung der Wiederfindungsrate an beschallten Vesikeln durchgeführt:

Coenzym Q10-haltige MLV (SLH/DCP/Q10 10 + 0,5 + 0,5) wurden in einem kalibrierten Reagenzglas hergestellt, beschallt und (unter Abspülen der Beschallungsspitze) auf eine 8 ml-Marke aufgefüllt (LK = 30 mg/ml).

Bei diesen Vesikeln betrug die Coenzym Q10-Wiederfindungsrate $98,8 \pm 0,4\%$ ($n = 2$).

7. Prüfung auf reduziertes Coenzym Q10

Geräte und Materialien

Uvicon 810 Spectrophotometer, Anacomp 220 Rechner, Plotter 800; Fa. Kontron, Eching bei München
Küvetten QS 100, 10 mm Schichtdicke; Fa. Hellma, Müllheim/Baden
Rotationsverdampfer Rotavapor R; Fa. Büchi, Flawil, Schweiz
Laborzentrifuge UJ 1; Fa. Christ, Osterode
n-Hexan für die UV-Spektroskopie; Fa. Merck, Darmstadt

Durchführung

Voraussetzung für die Prüfung auf reduziertes Coenzym Q10 (70) ist die Abtrennung von störendem Lipid:

Gemäß einer in der Literatur beschriebenen, selektiven Coenzym Q10-Extraktion (65) wurden 0,3 ml Liposomenprobe in einem Zentrifugenglas mit 0,2 ml Wasser, 2,5 ml Methanol/Petrolether (3 + 2) und 1 ml Aceton versetzt und 15 min geschüttelt. Phasentrennung wurde durch kurze Zentrifugation (2000 UPM) erreicht. Nach Abziehen der Petroletherphase (Pasteurpipette) wurde noch 3mal mit 1 ml Petrolether extrahiert. Die vereinigten filtrierte Petroletherphasen wurden am Rotationsverdampfer in einem 25 ml-Rundkolben zur Trockene eingedampft.

Nach Zugabe von 5 ml n-Hexan wurde der Extrakt zur Oxidation mit 1 ml Eisen-III-chloridlösung (2%ig in 2n Schwefelsäure) versetzt und 30 Minuten bei 50°C am Rotationsverdampfer inkubiert (Rotation auf Höchststufe, ohne Vakuum). Anschließend wurde 4mal mit 4 ml n-Hexan extrahiert. Die auf 25 ml aufgefüllte n-Hexanphase wurde bei 272 nm UV-spektroskopisch vermessen. Die Extinktion des Auszugs wurde verglichen mit einem in n-Hexan gelösten Extrakt, der nicht mit Oxidationsmittel behandelt worden war.

Die Auswertung erfolgte über eine Eichgerade von Coenzym Q10 in n-Hexan.

8. Prüfung auf nicht inkorporiertes Coenzym Q10

Geräte und Materialien

Uvicon 810 Spectrophotometer, Anacom 220 Rechner, Plotter 800; Fa. Kontron, Eching bei München
Küvetten QS 100, 10 mm Schichtdicke; Fa. Hellma, Müllheim/Baden
Vortex Mischer Nr. 34524-200; Fa. Cenco, Breda, Holland
Laborzentrifuge UJ 1; Fa. Christ, Osterode
n-Pentan für die UV-Spektroskopie; Fa. Merck, Darmstadt

Durchführung

Die Extraktion von nicht inkorporiertem Coenzym Q10 wurde nach Angaben in der Literatur (67,76) folgendermaßen durchgeführt: Bei Vesikeln mit unterschiedlichem Coenzym Q10-Gehalt wurden die Probenvolumina so gewählt, daß jeweils ca. 0,9 mg Coenzym Q10 enthalten waren. Mit Dispersionspuffer wurde auf ein Volumen von 1,2 ml ergänzt. Die Proben wurden 10 min bei 30°C in einem 10 ml-Zentrifugenglas mit Schliffstopfen temperiert. Anschließend wurden 5 ml n-Pentan zugegeben und sofort 3 Minuten mit dem Vortex-Mischer auf Höchststufe gemischt. Nach Phasentrennung über 3minütige Zentrifugation bei 2000 UPM wurden 2,5 ml der Pentanphase abgezogen, in trockene Küvetten gefüllt und bei 270 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte über eine

Eichgerade von Coenzym Q10 in n-Pentan. Die Bestimmung wurde bei jeder Charge zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse stellen bei jeder Rezeptur den Mittelwert aus 2 Chargen dar. Die relative Standardabweichung der Bestimmung des nicht inkorporierten Coenzym Q10 war mit $\pm 15\%$ ($n = 5$) zwar hoch, lag aber weit unterhalb der gefundenen Unterschiede zwischen den Rezepturen (über 100%).

9. DSC-Untersuchungen

Geräte und Materialien

DSC-4-Gerät mit Datenverarbeitung und Graphikplotter; Fa. Perkin-Elmer, Überlingen
Universal-Verschlußpresse; Fa. Perkin-Elmer, Überlingen
Aluminium-Pfännchen 50 μl mit Deckel; Fa. Perkin-Elmer, Überlingen

Durchführung

Es wurden jeweils 40 μl Vesikeldispersion in die Pfännchen eingebracht und verschlossen. Die Aufzeichnung des Diagramms erfolgte gegen ein mit Puffer gefülltes Pfännchen mit einer Heizrate von $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Von jeder Rezeptur wurden mindestens zwei frisch eingefüllte Proben vermessen. Jeweils eine Probe wurde nach Abkühlung erneut aufgeheizt und registriert. Die charakteristischen Unterschiede im Thermogramm verschiedener Rezepturen konnten dabei reproduzierbar festgestellt werden. Der Phasenübergang war reversibel.

Bei dem unterschiedlichen Anstieg der Basislinie der verschiedenen Thermogramme handelt es sich um eine bei thermoanalytischen Messungen übliche, gerätebedingte Schwankung, die auf die Auswertung keinen Einfluß hat.

III. Methoden zur Überprüfung der Lagerstabilität der Vesikeldispersionen

1. Untersuchung der Lipidoxidation

Geräte und Materialien

Uvicon 810 Spectrophotometer, Anacom 220 Rechner, Plotter

800; Fa. Kontron, Eching bei München

Küvetten QS 100, 10 mm Schichtdicke; Fa. Hellma, Müllheim/Baden

Durchführung

Während der Dialyse (22°C) und der Lagerung (2°C) wurden dem Mittelkompartiment des Lipoprep-Geräts bzw. dem Injektionsfläschchen mit Hilfe einer Kanüle in Zeitabständen ca. 250 µl Mischmizelllösung bzw. Vesikeldispersion entnommen. Der entstehende Volumenverlust wurde mit Stickstoff aufgefüllt. 200 µl Probe wurden in einem 25 ml-Meßkolben mit absolutem Ethanol aufgefüllt und zur Lyse sorgfältig geschüttelt. Von der Lösung wurde ein UV-Spektrum gegen einen Blindwert (200 µl Puffer in 25 ml Ethanol) aufgenommen und die Extinktionen bei 233 nm und 215 nm registriert. Für den Oxidationsindex nach KLEIN (87) wurde der Quotient (Extinktion 233 nm) / (Extinktion 215 nm) gebildet.

In der zur Untersuchung eingesetzten ethanolischen Verdünnung leistet das Cholat, dessen Konzentration während der Dialyse abnimmt, keinen Beitrag zum UV-Spektrum, wie eine entsprechende Überprüfung ohne Lipid und Arzneistoff ergab.

2. Visuelle Prüfung auf Sedimentation

Gerät

Glühlampe 60 Watt Concentra R 80; Fa. Osram, Molsheim/Elsaß, Frankreich

Durchführung

Vor der Beurteilung wurden die Injektionsfläschchen 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Betrachtung erfolgte an einem hellen Ort unter seitlicher Beleuchtung mit der Glühbirne, so daß die Blickrichtung senkrecht zum einfallenden Lichtstrahl war. Nach der Prüfung auf Bodensatz wurden die Fläschchen geschüttelt, um Schlierenbildungen zu beobachten. Von jeder Rezeptur wurden zwei Chargen untersucht, wobei praktisch keine Unterschiede im Sedimentationsverhalten der Chargen gleicher Zusammensetzung zu beobachten war. Lediglich die kaum sichtbare Schlierenbildung trat in wenigen Fällen nur bei einer der beiden Chargen auf und wurde in diesem Fall mit "(+)" bewertet.

3. Bestimmung des Zetapotentials

Geräte

Zetasizer IIc mit Meßzelle PC 3, 64-Kanal-Korrelator und Zetasizer-Software^{*)}; Fa. Malvern, Malvern, England
Olivetti Computer M24; Fa. Olivetti, Ivrea, Italien
Oki Microline 192 Drucker; Fa. Okidata, Düsseldorf

Durchführung

Die Vesikelpuben wurden mit Dispersionspuffer soweit verdünnt, daß das Zetasizer-Gerät ca. 100.000 counts/sec anzeigte. Die Potentialmessungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

Stromstärke: 1,4 bis 1,7 mA

Spannung : 85 bis 95 V

Feldstärke : 34 bis 38 V/cm

Bei Vesikeln auf SLH-Basis war eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse möglich, da die elektrophoretische Mobilität

^{*)} Der Fa. Müttek möchte ich für die Ermöglichung der Durchführung der Messungen des Zetapotentials in ihrem Anwendungslabor in Herrsching danken.

und damit das Zetapotential als einzelner, symmetrischer Peak angezeigt wurde. Abb. 34 zeigt den Ausschnitt eines Ergebnisausdrucks des Geräts.

Bei Vesikeln aus SL und EL hingegen wurden von Messung zu Messung unterschiedlich mehrere Peaks angezeigt.

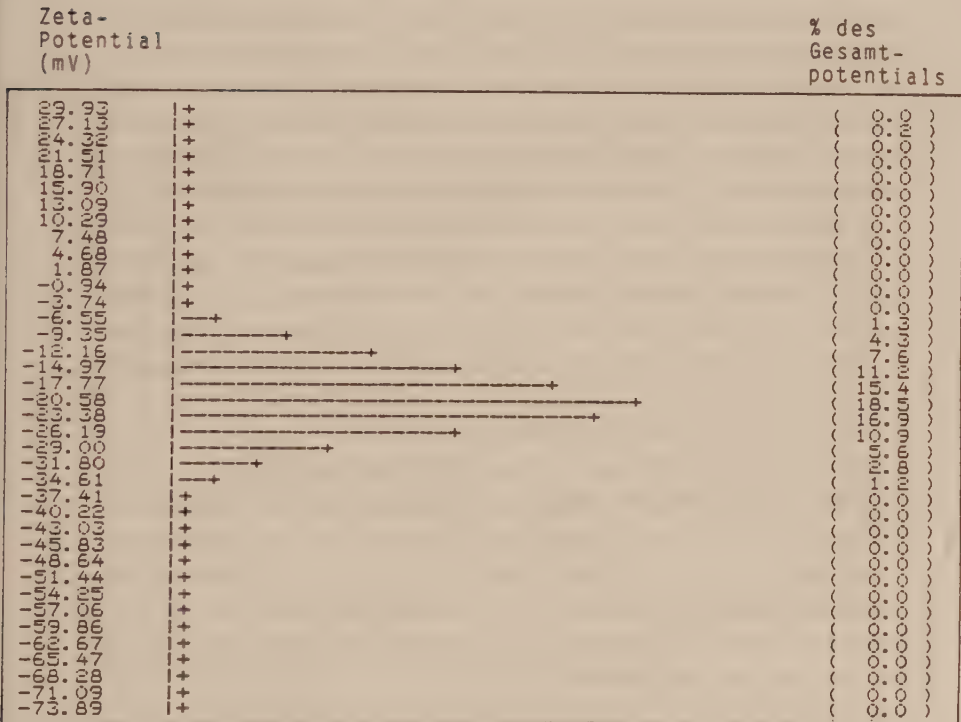


Abb. 34 Ausschnitt aus dem Ergebnisausdruck des Zetasizer IIc bei Detergendsdialyse-Vesikeln mit 10 Mol% DCP (SLH/DCP/Q10 10 + 1,0 + 0,5)

D. Z u s a m m e n f a s s u n g

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Herstellung und Prüfung von kleinen unilamellaren Liposomen in dispergierter Form als intravenös applizierbare Arzneistoffträger für das wasserunlösliche Kardiakum Coenzym Q10.

Im Vergleich zu parenteralen Zubereitungen von Coenzym Q10 in Form eines nichtionischen Tensidsolubilisats wird von einer liposomalen Zubereitung eine günstigere Organverteilung und Metabolisierung einhergehend mit einer verbesserten Verträglichkeit erwartet.

Die Herstellung der kleinen unilamellaren Liposomen sollte in erster Linie über die Detergensdialyse erfolgen, die bisher neben der Hochdruckdüsenhomogenisierung als einzige Methode eine Übertragung in den Produktionsmaßstab ermöglicht.

Als Lipidmaterial sollte vornehmlich kostengünstiges ungesättigtes sowie hydriertes Sojalecithin eingesetzt werden.

Die Aufklärung des Einflusses der Zusammensetzung des Vesikelmwandmaterials und der Herstellungsmethode der Vesikel auf Durchmesser, Homogenität und Lagerstabilität der Dispersionen bildete den Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen.

Dabei galt es, therapeutisch anwendbare Coenzym Q10-Konzentrationen in den Präparationen zu erreichen.

Die Bestimmung des Vesikeldurchmessers und der Homogenität direkt nach der Herstellung und während der Lagerung erfolgte hauptsächlich über Dynamisches Laser-Light-Scattering. Die Ergebnisse dieser Methode wurden mit Ergebnissen aus gelchromatographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen verglichen und abgesichert.

Ein Einblick in die unterschiedlichen Eigenschaften der Membranstruktur der einzelnen Vesikelpräparationen konnte über Analytische Ultrazentrifugation und Registrierende Differential-Kalorimetrie (DSC) gewonnen werden.

Im wesentlichen ergaben sich folgende Befunde:

1. Über das Detergendsialyse-Verfahren können, bezogen auf 100 Mol% Phospholipideinsatz, bis zu 5 Mol% Coenzym Q10 in Präparationen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung zugesetzt werden, ohne die Polydispersität der entstehenden Vesikel im Vergleich zu den entsprechenden arzneistofffreien Präparationen wesentlich zu verschlechtern. Der Lecithineinsatz kann in diesen Zubereitungen bis zu 45 mg/ml betragen.

Die homogensten arzneistoffhaltigen Vesikeldispersionen mit einer Polydispersität, die der Qualität monodisperser Latexkugeln gleichkommt, erhält man dabei unter Verwendung von ungesättigtem Ei- oder Sojalecithin, unabhängig von Hilfsstoffzusätzen, oder unter Verwendung von hydriertem Sojalecithin mit einem Zusatz von 10 Mol% Cholesterol. Wird der Coenzym Q10-Zusatz auf 2,5 Mol% beschränkt, so lassen sich auch Vesikel aus hydriertem Sojalecithin ohne Hilfsstoffzusatz mit geringster Polydispersität über das Detergendsialyse-Verfahren herstellen.

2. Die kleinsten Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 20 nm erzielt man unabhängig vom Coenzym Q10-Zusatz beim Detergendsialyse-Verfahren unter Einsatz ungesättigter Lipide in Kombination mit einem Sorbit-isotonisierten Dispersionsmedium.

Von den NaCl-isotonisierten arzneistoffhaltigen Zubereitungen geringer Polydispersität besitzen die cholesterolhaltigen Vesikel aus hydriertem Sojalecithin (SLH) mit ca. 100 bis 200 nm einen bis zu vierfach höheren Durchmesser im Vergleich zu den restlichen Präparationen.

Solange beim Coenzym Q10-Einbau ein Zusatz von 5 Mol% nicht überschritten wird, hat dieser Zusatz einen verkleinernden Effekt auf den entstehenden Vesikeldurchmesser. Dieses Phänomen ist am stärksten ausgeprägt bei SLH-Präparationen mit einer Lecithinkonzentration von 45 mg/ml und bei SLH-Präparationen, die einen Cholesterolzusatz

von 10 Mol% enthalten. In diesen beiden Fällen wird durch den Arzneistoffzusatz der mittlere Durchmesser um fast 300% reduziert, und anstelle einer breiten Größenverteilung entsteht eine Population einheitlicher Größe.

3. Im Gegensatz zum Detergendsdialyse-Verfahren erlauben die Hochdruckdüsenhomogenisierung und die nicht in den Produktionsmaßstab übertragbare Beschallungsmethode die Präparation von Vesikeln aus hydriertem Sojalecithin (SLH) und Cholesterol im Verhältnis 1:1. Bei diesem Cholesterolgehalt können über die Beschallungsmethode Coenzym Q10-haltige Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm hergestellt werden, die von ihrer Homogenität her mit den Vesikeln aus dem Detergendsdialyse-Verfahren vergleichbar sind. Bei allen übrigen untersuchten SLH-haltigen Präparationen nach dem Hochdruckdüsenhomogenisierungs- und dem Beschallungsverfahren entstehen Vesikel mit sehr viel breiterer Größenverteilung.
4. Werden die Ergebnisse aus dem Dynamischen Laser-Light-Scattering-Verfahren bezüglich der Vesikeldurchmesser und Homogenitäten mit den entsprechenden Ergebnissen aus gel-chromatographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen verglichen, so zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung.
5. Die Detergendsdialyse-Vesikel aus hydriertem Sojalecithin weisen im Vergleich zu den entsprechenden Vesikeln aus ungesättigten Lipiden um 10 bis 16fach erhöhte apparente Sedimentationskoeffizienten auf, bei Erhöhung der Vesikeloberfläche um das lediglich 1,6 bis 2fache.
6. Bei den Präparationen nach dem Detergendsdialyse-Verfahren finden sich im Endprodukt 90 bis 97% des eingesetzten Lipidmaterials. Der Coenzym Q10-Gehalt beträgt je nach Lipid ca. 75 bis 85% der zugesetzten Konzentration. Therapeutisch anwendbare Wirkstoffkonzentrationen wurden erreicht

mit einer Coenzym Q10-Konzentration von bis zu 2,25 mg/ml in homogenen Präparationen.

Der zur Erzielung homogener Präparationen bei der Beschallungsmethode notwendige Aufreinigungsschritt zur Abtrennung von großen Vesikeln und Titanpartikeln bedingt einen Lipid- und Arzneistoffverlust von 30 bis 50% im Endprodukt.

7. In homogenen Coenzym Q10-haltigen Vesikeldispersionen nach dem Detergendsialyse-Verfahren wurde ein Anteil an nicht in die Membran inkorporiertem Coenzym Q10 von unter 2% bestimmt. Wird bei Vesikeln aus hydriertem Sojalecithin der Coenzym Q10-Zusatz von 5 Mol% auf 10 Mol% erhöht, so steigt der nicht inkorporierte Coenzym Q10-Anteil in der Zubereitung auf ca. 11% an.
8. Über Registrierende Differential-Kalorimetrie (DSC) kann gezeigt werden, daß der Einbau von Coenzym Q10 in Bilayer aus hydriertem Sojalecithin nach dem Detergendsialyse-Verfahren den Phasenübergang der Membranstruktur verändert. Aus diesem Einfluß kann abgeleitet werden, daß zumindest ein Teilbereich des Coenzym Q10-Moleküls parallel zu den Fettsäureketten der Phospholipidmoleküle in den Bilayer eingelagert ist.
9. Die Vesikel aus ungesättigtem Sojalecithin nach dem Detergendsialyse-Verfahren unterliegen trotz Zusatz von α -Tocopherol und Begasung der Präparationen mit Stickstoff einer raschen oxidativen Zersetzung. Wird das Dispersionsmedium der Vesikel zur Chelatisierung katalytisch wirkender Schwermetallionen mit 1 mM Di-Na-EDTA versetzt, so ist über einen Zeitraum von 4 Wochen keine oxidative Veränderung des Lipidwandmaterials zu beobachten.
10. Eine visuelle Beurteilung sämtlicher Vesikelpräparationen über einen Zeitraum von 12 Wochen ergab, daß zur vollständigen Unterbindung von Sedimentationsprozessen in Dispersionen von Detergendsialyse-Vesikeln aus hydriertem Soja-

lecithin ein Einbau von 10 Mol% Ladungsträger in die Membran notwendig ist. Für Vesikel aus SLH mit einem Zusatz von 10 Mol% Dicetylphosphat konnte ein negatives Zetapotential von -16 bis -19 mV bestimmt werden.

11. Detergentsdialyse-Vesikel aus ungesättigtem und hydriertem Sojalecithin (SL und SLH) mit bis zu 5 Mol% Coenzym Q10 erwiesen sich bei einer Lecithinkonzentration bis zu 45 mg/ml über 12 Wochen bei 2°C als lagerstabil in bezug auf Vesikeldurchmesser und Homogenität.
Für SLH-Vesikel kann die Stabilitätsaussage entsprechend des bisherigen Beobachtungszeitraums auf eine Lagerdauer von 6 bis 10 Monaten erweitert werden. Die Lagerung ist dabei nicht auf 2°C beschränkt, sondern kann auch bei 20°C erfolgen.
12. Sowohl arzneistofffreie als auch Coenzym Q10-haltige Vesikel aus hydriertem Sojalecithin nach dem Hochdruckdüsenhomogenisierungs- und dem Beschallungsverfahren zeigen ohne Cholesterolzusatz über einen Lagerzeitraum von 12 Wochen eine Zunahme des mittleren Durchmessers um 20 bis 60 nm.
Bei einem Cholesterolanteil von 50 Mol% erweisen sich die Vesikel aus beiden Verfahren über 12 Wochen als lagerstabil.

E. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- (1) BANGHAM, A.D., M.M. STANDISH und J.C. WATKINS
J. Mol. Biol. 13, 238 (1965)
- (2) EIBL, H.
Angew. Chem. 96, 247 (1984)
- (3) SZOKA, F. und D. PAPAHAJDOPOULOS
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467 (1980)
- (4) SESSA, G. und G. WEISSMANN
J. Biol. Chem. 245, 3295 (1970)
- (5) OSTRO, M.J.
Spektrum der Wissenschaft, März 1987
- (6) KLAUSNER, A.
Bio/Technology 6, 20 (1988)
- (7) OSTRO, M.J.
Liposomes
Dekker, New York 1987
- (8) LENAIZ, G. und M. DEGLI ESPOSTI
in Coenzyme Q
Wiley, Chichester 1985
- (9) KISHI, H., N. KANAMORI, S. NISHII, E. HIRAKA,
T. OKAMOTO und T. KISHI
Biomed. Clin. Aspects Coenzyme Q 4, 131 (1984)
- (10) KIMURA, A., H. YAMAGUCHI, K. WATANABE, M. HAYASHI und
S. AWAZU
J. Pharm. Pharmacol. 38, 659 (1986)
- (11) YAMAGUCHI, H., K. WATANABE, M. HAYASHI und S. AWAZU
J. Pharm. Pharmacol. 36, 766 (1984)
- (12) TAKADA, M., T. YUZURIHA, K. KATAYAMA, C. YAMATO und
N. KOYAMA
J. Nutr. Sci. Vitaminol. 31, 115 (1985)

- (13) SUNAMOTO, J., K. IWAMOTO, M. TAKADA, T. YUZURIHA und K. KATAYAMA
Polym. Sci. Technol. (Plenum) 23, 157 (1983)
- (14) TAKADA, M., T. YUZURIHA, K. KATAYAMA und J. SUNAMOTO
Eur. Pat. Appl. EP 69,399 (1983)
- (15) MIURA, Y., T. IDO, K. ISHIWATA, T. TAKAHASHI, S. WATANUKI, Y. KAGAYA, E. NOZAKI, N. ISHIDE, Y. MARUYAMA und T. TAKISHIMA
Biomed. Clin. Aspects Coenzyme Q 5, 111 (1986)
- (16) ASANGER, M.
Dissertation ETH Zürich Nr. 7413 (1983)
- (17) ARZNEIMITTELKOMMISSION DER DEUTSCHEN APOTHEKER
Pharmazeutische Zeitung 129, 2978 (1984)
- (18) ATTWOOD, D. und A.T. FLORENCE
Surfactant Systems
Chapman and Hall, London/New York 1983
- (19) SENIOR, J.H.
CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 3(2), 123 (1987)
- (20) KIBAT, P.G.
Dissertation Heidelberg 1987
- (21) ARROWSMITH, M., J. HADGRAFT und I.W. KELLAWAY
Int. J. Pharm. 16, 305 (1983)
- (22) BERTSCHI, W.
Dissertation ETH Zürich Nr. 7149 (1982)
- (23) STAMP, D. und R.L. JULIANO
Can. J. Physiol. Pharmacol. 57, 535 (1979)
- (24) SCHWENDENER, R.A.
Cancer Drug Del. 3, 123 (1986)

- (25) WEDER, H.G. und O. ZUMBÜHL
in Liposome Technology, Vol. 1
CRC Press, New York 1984
- (26) ASANGER, M. und H.G. WEDER
Acta Pharm. Technol. 31, 215 (1985)
- (27) CROMMELIN, D.J.A.
J. Pharm. Sci. 73, 1559 (1984)
- (28) DOUGLAS, S.J. und S.S. DAVIS
NATO ASI Ser. A 113, 265 (1986)
- (29) HEATH, T.D., N.G. LOPEZ und D. PAPAHA DJOPOULOS
Biochim. Biophys. Acta 820, 74 (1985)
- (30) PAPAHA DJOPOULOS, D., M. COWDEN und H. KIMELBERG
Biochim. Biophys. Acta 330, 8 (1973)
- (31) LADBROOKE, B.D. und D. CHAPMAN
Chem. Phys. Lipids 3, 304 (1969)
- (32) KONINGS, A.W.T.
in Liposome Technology, Vol. 1
CRC Press, New York 1984
- (33) TRÄUBLE, H. und D.H. HAYNES
Chem. Phys. Lipids 7, 324 (1971)
- (34) CAREY, M.C. und D.M. SMALL
Arch. Intern. Med. 130, 506 (1972)
- (35) SHANKLAND, W.
Chem. Phys. Lipids 4, 109 (1970)
- (36) LENA Z, G.
in Coenzyme Q
Wiley, Chichester 1985
- (37) LASIC, D.D.
Biochim. Biophys. Acta 692, 501 (1982)

- (38) HUANG, C.H.
Biochemistry 8, 344 (1969)
- (39) LELKES, P.I. und J.E. FRIEDMAN
J. Biol. Chem. 260, 1796 (1985)
- (40) MAYHEW, E., G.T. NIKOLOPOULOS, J.J. KING und
A.A. SICILIANO
Pharmaceutical Manufacturing 2, 18 (1985)
- (41) MAYER, L.D., M.J. HOPE und P.R. CULLIS
Biochim. Biophys. Acta 858, 161 (1986)
- (42) RAO, L.S.
in Liposome Technology, Vol. 1
CRC Press, New York 1984
- (43) KAUFMANN-KOLLE, P.
Dissertation Braunschweig 1986
- (44) TENCHOV, B.G., T.K. YANEV, M.G. TIHOVA und R.D. KOYNOVA
Biochim. Biophys. Acta 816, 122 (1985)
- (45) HAUSER, H.O.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1049 (1971)
- (46) REYNOLDS, J.A., Y. NOZAKI und C. TANFORD
Anal. Biochem. 130, 471 (1983)
- (47) SCHURTENBERGER, P. und H. HAUSER
Biochim. Biophys. Acta 778, 470 (1984)
- (48) PHARMACIA FINE CHEMICALS
Sephacryl S-400, S-500, S-1000 Superfine
Firmenschrift 1981
- (49) MERCK
Fractogel TSK
Firmenschrift 1986
- (50) ACKERS, G.K.
J. Biol. Chem. 242, 3237 (1967)

- (51) MALVERN INSTR.
Autosizer II C User Manual (1987)
- (52) ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS
und J.D. WATSON
Molekularbiologie der Zelle
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1986
- (53) BANGHAM, A.D., M.W. HILL und N.G.A. MILLER
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7, 469 (1978)
- (54) OLSON, F., C.A. HUNT, F.C. SZOKA, W.J. VAIL und
D. PAPAHA DJOPOULOS
Biochim. Biophys. Acta 557, 9 (1979)
- (55) OLLIVON, M., A. WALTER und R. BLUMENTHAL
Anal. Biochem. 152, 262 (1986)
- (56) HUANG, C. und J.T. MASON
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 308 (1978)
- (57) BRUNNER, J., P. SCRABAL und H. HAUSER
Biochim. Biophys. Acta 455, 322 (1976)
- (58) ZUMBÜHL, O. und H.G. WEDER
Biochim. Biophys. Acta 640, 252 (1981)
- (59) ELIAS, H.G.
Ultrazentrifugationsmethoden
Beckman Instruments GmbH, München 1961
- (60) HUANG, C.H. und J.P. CHARLTON
J. Biol. Chem. 246, 2555 (1971)
- (61) HAUSER, H., E.G. FINER und D. CHAPMAN
J. Mol. Biol. 53, 419 (1970)
- (62) TER-MINASSIAN-SARAGA, L. und G. ALBRECHT
Int. J. Pharm. 24, 149 (1985)

- (63) SUGIYAMA, S., M. HATTORI, S. NAGAI, T. TAKAMURA und
T. OZAWA
Drug Res. 35, 23 (1985)
- (64) HIROTA, K. und M. KAWASE
J. Chromatogr. 310, 204 (1984)
- (65) KRÖGER, A.
in Methods in Enzymology, Vol. 53
Academic Press, New York 1978
- (66) ERNSTER, L., E. GLASER und B. NORLING
in Methods in Enzymology, Vol. 53
Academic Press, New York 1978
- (67) DEGLI ESPOSTI, M., E. BERTOLI, G. PARENTI-CASTELLI,
R. FATO, S. MASCARELLO und G. LENAZ
Arch. Biochem. Biophys. 210, 21 (1981)
- (68) OZAWA, T.
in Coenzyme Q
Wiley, Chichester 1985
- (69) TAKADA, M. und J. WATANABE
J. Pharmacobio-Dyn. 10, 124 (1987)
- (70) OZAWA, Y., Y. MIZUSHIMA, I. KOYAMA, M. AKIMOTO,
Y. YAMAGATA, H. HAYASHI und H. MURAYAMA
Drug Res. 36, 689 (1986)
- (71) ROOS, K.M.
Dissertation ETH Zürich Nr. 7768 (1985)
- (72) EISAI CO.
Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 59 10,511 (1984)
- (73) OHASHI, H., T. TAKAMI, N. KOYAMA, Y. KOGURE und K. IDA
Eur. Pat. Appl. EP 83,108 (1983)
- (74) UNGER-BADY, M.
Dissertation Berlin 1988

- (75) SUNAMOTO, J., K. IWAMOTO, T. TEZUKA, K. KADOSAKI und H. KONDO
Chem. Phys. Lipids 33, 127 (1983)
- (76) STIDHAM, M.A., T.J. MCINTOSH und J.N. SIEDOW
Biochim. Biophys. Acta 767, 423 (1984)
- (77) KATSIKAS, H. und P.J. QUINN
FEBS Letters 133, 230 (1981)
- (78) ELIASZ, A.W., D. CHAPMAN und D.F. EWING
Biochim. Biophys. Acta 448, 220 (1976)
- (79) GOMEZ-FERNANDEZ, J.C., F. ARANDA, A. ALONSO und F.M. GONI
in Vectorial Reactions in Electron and Ion Transport
in Mitochondria and Bacteria
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981
- (80) SIEDOW, J.N. und M.A. STIDHAM
Biomed. Clin. Aspects Coenzyme Q 5, 63 (1986)
- (81) LASIC, D.D.
Vestn. Slov. Kem. Drus. 32, 21 (1985)
- (82) ARANDA, F.J. und J.C. GOMEZ-FERNANDEZ
Biochim. Biophys. Acta 820, 19 (1985)
- (83) HUNT, C.A. und S. TSANG
Int. J. Pharm. 8, 101 (1981)
- (84) MEAD, J.F.
J. Am. Oil Chem. Soc. 57, 393 (1980)
- (85) GAST, K., D. ZIRWER, A.-D. LADHOFF, J. SCHREIBER,
R. KOELSCH, K. KRETSCHMER und J. LASCH
Biochim. Biophys. Acta 686, 99 (1982)
- (86) STRICKER, H. und H. MÜLLER
Pharm. Ind. 46, 1175 (1984)

- (87) KLEIN, R.A.
Biochim. Biophys. Acta 210, 486 (1970)
- (88) GALANOPOULOU, G., R.F.G. BOOTH und P.J. QUINN
Biochem. Soc. Trans. 10, 20 (1982)
- (89) SUCKER, H., P. FUCHS und P. SPEISER
Pharmazeutische Technologie
Thieme Verlag Stuttgart, 1978
- (90) TIEN, M., L.A. MOREHOUSE, J.R. BUCHER und S.D. AUST
Arch. Biochem. Biophys. 218, 450 (1982)
- (91) YOSHIHARA, E. und T. NAKAE
FEBS Letters 166, 49 (1984)
- (92) PETERSEN, N.O. und S.I. CHAN
Biochim. Biophys. Acta 509, 111 (1978)
- (93) ADAMS, D.H., G. JOYCE, V.J. RICHARDSON, B.E. RYMAN
und H.M. WISNIEWSKI
J. Neurol. Sci. 31, 173 (1977)
- (94) MULLER, R.H., S.S. DAVIS, L. ILLUM und E. MAK
NATO ASI Ser., Ser. A 113, 239 (1986)
- (95) WONG, M. und T.E. THOMPSON
Biochemistry 21, 4133 (1982)
- (96) FROEKJAER, S., E.L. HJORTH und O. WOERTS
in Optimization of Drug Delivery
Alfred Benzon Symposium 17, Munksgaard, Copenhagen
(1982)
- (97) MCCONNELL, D.S. und S.E. SCHULLERY
Biochim. Biophys. Acta 818, 13 (1985)
- (98) WEINER, A.L.
in Liposomes
Marcel Dekker, Inc., New York und Basel (1987)

- (99) DAVIS, S.S.
in Optimization of Drug Delivery
Alfred Benzon Symposium 17, Munksgaard, Copenhagen
(1982)
- (100) FREISE, J.
in Liposome Technology, Vol. 1
CRC Press, New York 1984
- (101) MENTRUP, E., P. BUTZ, H. STRICKER und H. LUDWIG
Pharm. Ind. 50, 363 (1988)
- (102) NÜRNBERG, N.
in DAB 9 Kommentar, Band 3
Wissensch. Verlagsges. mbH, Stuttgart, Govi-Verlag
GmbH, Frankfurt 1988
- (103) VAN BOMMEL, E.M.G. und D.J.A. CROMMELIN
Int. J. Pharm. 22, 299 (1984)
- (104) KIRBY, C. und G. GREGORIADIS
Bio/Technology 2, 979 (1984)
- (105) FOLKERS, K. und Y. YAMAMURA
Biomed. Clin. Aspects Coenzyme Q 3 (1981)
- (106) TOMONO, Y., J. HASEGAWA, T. SEKI, K. MOTEGI und
N. MORISHITA
Int. J. Clin. Pharmacol., Ther. Toxicol. 24, 536
(1986)
- (107) MOSER, U.
in DAB 9 Kommentar, Band 3
Wissensch. Verlagsges. mbH, Stuttgart, Govi-Verlag
GmbH, Frankfurt 1988
- (108) MATSUDA, Y. und R. MASAHARA
J. Pharm. Sci. 72, 1198 (1983)

- (109) PHARMACIA
Gel filtration
Firmenschrift 1981
- (110) DWIGHT, H.B.
Mathematical Tables
New York, Dover 1961
- (111) EIBL, H. und W.E.M. LANDS
Anal. Biochem. 30, 51 (1969)

Lebenslauf

Angelika Schmid geboren am 10.12.1959 in Illertissen
als Tochter des Schuhleistenmodelleurs
Hubert Schmid und seiner Ehefrau Helga,
geb. Frosch

Schulbildung: 1966-1970 Volksschule Altenstadt/Iller
1970-1979 mathematisch-naturwissen-
schaftliches Gymnasium Kolleg der Schul-
brüder in Illertissen
Abitur: 27.06.1979

Berufsausbildung:

Studium der Pharmazie: WS 1979/80 bis WS 1982/83 an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Praktische Ausbildung: Mai 1983 bis April 1984 in der Kranich-
Apotheke in München

Approbation als

Apotheker: 21.08.1984

Wissenschaftliche

Tätigkeit: seit August 1984 unter der Anleitung
von Herrn Prof. Dr. K. Thoma am
Institut für Pharmazie und Lebens-
mittelchemie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Berufliche Tätigkeit: von August 1984 bis Januar 1986 als
teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche
Hilfskraft, seit Februar 1986 als voll-
zeitbeschäftigte wissenschaftliche
Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmazeu-
tische Technologie der Ludwig-Maxi-
milians-Universität München.

